Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. H. Schweitzer

UNTERSUCHUNG ZUM POLYMORPHISMUS DER GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE (E.C.2.7.7.12.) IN NORDRHEIN-WESTFALEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

EVERHARD HAASS

1980

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0150

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. H. Schweitzer

UNTERSUCHUNG ZUM POLYMORPHISMUS DER GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE (E.C.2.7.7.12.) IN NORDRHEIN-WESTFALEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

EVERHARD HAASS

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.Krüskemper

Referent
gez.: Prof.Dr.Schweitzer

Korreferent
gez.: Prof.Dr.Brüster

Herrn Prof.Dr.H.Schweitzer bin ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit zu Dank verpflichtet.
Herrn Dr.J.Henke danke ich für seine ständige Bereitschaft zu beratendem Gespräch und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
Herrn Dipl.-Math.Dr.M.Baur,Bonn,bin ich dankbar für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.
Herrn Ing.(grad.) V.Fäthke,Mönchengladbach,sage ich Dank für die grafische Gestaltung der Arbeit.
Herr Dr.E.Osterhaus,Duisburg,stellte dankenswerterweise einen Teil der Blutproben zur Verfügung.
Frau I.Flach möchte ich für ihre Unterstützung bei der Ausführung der Versuche danken.

Untersuchung zum Polymorphismus der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (E.C.2.7.7.12.) in Nordrheinwestfalen

Inhalt:

1. Einleitung
1.1 Ziel der Untersuchung
1.2 Erläuterung der Grundbegriffe
1.3 Funktion der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase im Stoffwechsel
1.4 Pathophysiologie
1.5 Nomenklatur der Phänotypen und Genotypen des Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Polymorphismus
1.6 Entdeckung von Varianten mit der Stärkegelelektrophorese
1.7 Feststellung von Enzymaktivität außerhalb Erythrozyten
1.8 Chromosomale Lokalisation der Allele
1.9 Zusammenstellung aller Methoden zur Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase
2. Material und Methoden
2.1 Blutproben
2.2 Aufbereitung der Hämolysate zur Elektrophorese
2.3 Zusammensetzung von Elektrophoresegel und -puffer
2.4 Anfärbung
3. Ergebnisse
3.1 Beschreibung der sechs in der Stärkegelelektrophorese nachgewiesenen Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Phänotypenbandenmuster
3.2 Genfrequenzen der untersuchten Bevölkerungsstichprobe aus Nordrhein-westfalen
3.3 Mutter-Kind-Kombinationen
3.4 Verwendung des Polymorphismus der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase in der Abstammungsbegutachtung
3.5 Einfluß von Alterung und Lagerungsbedingungen der Blutproben auf das Zymogramm

4. Diskussion

4.1 Vorteile der angewandten Elektrophoresemethode

4.2 Einfluß der eingeimpften Hämolysatmenge auf die Bandenmuster

4.3 Haltbarkeit der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

4.4 Zusammenhang des Auftretens von Enzymvarianten und Erkrankungen

4.5 Die s-Bande

4.6 Vergleich von populationsgenetischen Daten

4.7 Vererbungsmodus der Allele

4.8 Vorteile des Drei-Allele-Systems in der Abstammungsbegutachtung

1. EINLEITUNG

1.1 ZIEL DER UNTERSUCHUNG

Ziel der Untersuchung ist es,populationsgenetische Daten über den Polymorphismus der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Abkürzung: gt) in Nordrheinwestfalen zu erheben.In Deutschland liegen bislang wenige Veröffentlichungen zur Verteilung des gt-Polymorphismus in der Bevölkerung vor.Es handelt sich dabei um die Untersuchungen von BISSBORT in Südwestdeutschland (13),KALOUD in Franken (48),KÜHNL in Hessen (5o) und MARTIN in Berlin (56).
Ich erhielt daher die Aufgabe,eine Bevölkerungsstichprobe aus Nordrheinwestfalen auf die Verteilung der Phänotypen des gt-Polymorphismus unter Berücksichtigung der Allele gt^N,gt^D und gt^{LA} zu untersuchen.Weiterhin sollte eine Betrachtung der forensischen Bedeutung diese Enzymsystems in der Abstammungsbegutachtung vorgenommen werden.

1.2 ERLÄUTERUNG DER GRUNDBEGRIFFE

Bei der Untersuchung einer Bevölkerungsstichprobe auf die Verteilung im gt-Polymorphismus lag es nahe,Erythrozyten als Untersuchungsmaterial zu wählen,da diese als Untersuchungsgut mit einfachen Verfahren gewonnen werden können.
In den Erythrozyten existiert allerdings nicht nur ein Enzymtyp,sondern verschiedene Isoenzyme sind bekannt.Isoenzyme zeichnen sich durch folgende Eigenheiten aus: Diese Enzyme haben die gleichen katalytischen Eigenschaften.Sie setzen alle das gleiche Substrat um.Unterschiede sind aber in der Proteinstruktur vorhanden.Dadurch sind sie elektrophoretisch und chromatographisch trennbar,und sie können verschiedene Aktivität aufweisen.
Wieviele solcher Enzymvarianten es in einem System gibt,hängt von der Anzahl der Allele für das betreffende Enzym ab.Wenn zwei oder mehr Allele vorkommen (multiple Allelie) ,spricht man von einem Polymorphismus.
Das Auftreten von Isoenzymen wurde zuerst von WIELAND (98) beschrieben.Er wies aufgrund verschiedener elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit

Enzymfraktionen der Laktat-Dehydrogenase (LDH) nach.Für jede Fraktion konnte Enzymaktivität nachgewiesen werden.Die Anzahl der Fraktionen,auch Banden genannt,sowie deren Stärke sind charakteristisch für die jeweils untersuchten Organe.

Die Stärkegelelektrophorese,die bereits 1955 von SMITHIES (9o)eingeführt worden war,wurde nach der Entdeckung WIELANDs gezielt zur Untersuchung von Isoenzymen eingesetzt.Die erste "Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels" führten HUNTERGMARKERT (43) aus.

Heute ist für sehr viele Enzyme ein Polymorphismus bekannt,so auch für die gt.Im Jahre 1953,zur Zeit der ersten Isolierung der gt aus galaktose-adaptierten Hefezellen (45),war man davon aber noch weit entfernt.Denn zunächst interessierte an der gt hauptsächlich ihre Funktion im Stoffwechsel.

1.3 FUNKTION DER GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE IM STOFFWECHSEL

Die gt ist ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels.Der von der gt katalysierte Stoffwechselvorgang wurde erstmals 1951 von LELOIR (52) erkannt und wird nach ihm benannt.Heute kennen wir den Enzymmechanismus im Detail (25,3o).

Im ersten Schritt wird Galaktose durch energiereiches Phosphat in einem nicht umkehrbaren Schritt aktiviert:

(a) Galaktose + ATP ——— Galaktose-1-Phosphat + ADP

Der zweite Schritt endet in der Übertragung von UDP-Glukose auf Galaktose-1-Phosphat.Es entsteht Glukose-1-Phosphat und UDP-Galaktose.An diesem Schritt ist die gt beteiligt.

(b) Gal-1-P + UDP-Glu $\xrightarrow{gt}$ UDP-Gal + Glu-1-P

Der dritte Schritt beinhaltet die Epimerisation am vierten C-Atom mit Hilfe von Epimerase und NAD.

(c) UDP-Gal $\xrightarrow{\text{Epimerase und NAD}}$ UDP-Glu

Der letzte Vorgang überführt UDP-Glukose in Glukose-1-Phosphat:

(d) UDP-Glu + PP $\xrightarrow{\text{Pyrophosphorylase}}$ Glu-1-P + UTP

1974 isolierte WONG (99) bei E.coli eine gt-Zwischenstufe,die sog. Uridyl-Enzym-Intermediate,die wahrscheinlich zwei aktive Zentren besitzt (1oo). MARKUS (55) nimmt an,daß der Mechanismus der E.coli-gt auch beim Menschen vorhanden ist.Der Mechanismus in Schritt (b) sähe dann wie folgt aus:

(b1) UDP-Glu + gt ——— UDP-Glu...gt ——— UMP-gt + Glu-1-P

(b2) UMP-gt + Gal-1-P ——— UDP-Gal...gt ——— UDP-Gal + gt

1.4 PATHOPHYSIOLOGIE

Der zweite Interessenschwerpunkt bildete sich um die Pathophysiologie des Galaktosestoffwechsels.Bereits im Jahre 1908 wurde das klinische Bild des gt-Mangels durch V.REUSS (72) veröffentlicht,freilich ohne Kenntnis des Stoffwechselweges der Galaktose.Eine typische Beschreibung der Krankheit als Galaktosurie findet sich bei GÖPPERT (29).BELL (3) bezeichnet die Erkrankung als "Galaktose-Diabetes" und verwendet daneben eingeklammert den Begriff Galaktosämie.Diese Bezeichnung wird heute einheitlich für den gt-Mangel benutzt.Die Erkenntnis,daß es sich bei kongenitaler Galaktosämie um den Defekt der gt handelt,haben wir ISSELBACHER und KALCKAR zu verdanken (44,46).

ISSELBACHER untersuchte alle vier am Galaktose-Metabolismus beteiligten Enzyme bei Probanden mit und ohne Galaktosämie.Drei Enzyme waren bei beiden Gruppen etwa gleich aktiv.Nur die gt war bei galaktosämischen Patienten extrem niedrig.Die Galaktosämie ist also offenbar Folge eines Ein-Enzym-Defekts.

Das klinische Interesse richtete sich nun auf die frühzeitige Diagnose der Galaktosämie.Denn eine rechtzeitige,galaktosefreie Diät hilft das schwere Krankheitsbild zu vermeiden.Als Krankheitsfolgen des Enzymblocks mit folgender Anhäufung von Galaktose,Galaktitol und Galaktose-1-Phosphat wurden beschrieben: Ikterus,Hepatosplenomegalie,schlechtes Gedeihen, Anämie,Diarrhoe,Erbrechen,Aszites,Blutdrucksenkung und Krämpfe.Im Laufe der ersten Lebensmonate entwickeln sich zusätzlich eine Katarakt und

ein geistiger Entwicklungsrückstand (3o,42,84,87,89).
Von Anfang an schien sicher,daß es eine familiäre Disposition zur Galaktosämie gab.Mehrfaches Auftreten in einer Familie berichtet schon GÖPPERT (29). HOLZEL (4o) findet nicht nur bei von Galaktosämie Betroffenen,sondern auch bei deren nicht erkrankten Verwandten anomale Werte im oralen Galaktose-Toleranz-Test.Er schließt daraus,daß bei nicht normalen Werten in diesem Test ohne klinische Manifestation der Erkrankung das Galaktosämie-Gen rezessiv heterozygot vorhanden ist,bei manifester Galaktosämie homozygot vorliegt.
Ein Überlappen der Werte im Bereich zwischen heterozygot und normal konnte nicht befriedigend erklärt werden.HSIA (41) bemerkt dazu: "Sorgfältige physikalische oder biochemische Studien dürften klinische Abweichungen von der Norm auch in diesen Fällen zeigen.Für viele Bestimmungen wird die geeignete Methode noch gesucht,so auch bei der Galaktosämie."
Auch als es KALCKAR (47) im Jahre 1956 gelingt,in den Erythrozyten von galaktosämischen Kindern das Fehlen der Transferase-Aktivität nachzuweisen,bleibt die Unerklärlichkeit der Übergänge von Heterozygotenwerten zu denen homozygot Normaler bestehen.Es war nun zwar nachgewiesen,welches Enzym bei Galaktosämie betroffen ist.Die Methodik war aber nicht geeignet, leichte Veränderungen der Enzymaktivität festzustellen.
Dies gelang HOLZEL (4o) und DONELL (24).Sie fanden im oralen Galaktose-Belastungs-Test die verminderte Enzymaktivität bei den Verwandten der Patienten heraus,ohne allerdings sagen zu können,bei welchem Wert der Übergang von Normalen zu Heterozygoten liegt.SITZMANN (88) stellt bei der Durchführung eines intravenösen Galaktose-Belastungs-Tests sogar fest,daß Heterozygote mit 5o % der normalen Enzymaktivität Galaktose genau so schnell metabolisieren wie Normale.
Die biochemische Enzymaktivitätsmessung von HSIA (42) bringt die Differenzierung,trotz der Behauptung,den biochemischen Nachweis der Heterozygosität führen zu können,nicht.Denn auch hier überlappt die Enzymaktivität der angeblich Heterozygoten den Normalbereich.
Diese Übergänge weist auch der Sauerstoffverbrauchs-Test von KIRKMAN (49) auf.Er findet bei Eltern galaktosämischer Kinder 64 % der normalen Enzymaktivität,bei den Galaktosämischen selbst keine meßbare Aktivität.
DONELL (25) findet 196o als weitere Besonderheit Personen,deren Transferase-Aktivität an der Grenze der Null-Marke,also zwischen Heterozygoten und homozygot Kranken liegt.Bei allen Eltern von Kindern mit Galaktosämie

erhält er Heterozygotenwerte,was auf einen autosomal rezessiven Erbgang hinweist.
Sowohl BEUTLER (5) mit einem Methylenblauentfärbungs-Test wie auch HANSEN (36) mit der von ihm propagierten Kombination der Enzymaktivitätsmessung und Familienuntersuchung haben keine exakte Abtrennung der Heterozygoten von den Normalen ermöglicht.
Lediglich ROBINSON (74) erreicht mit Hilfe des C^{14}-Isotops eine Auftrennung in Normale,Heterozygote und Homozygote ohne eine Überschneidung der Wertebereiche.
Doch schon zwei Jahre später erwies sich,daß die Übergänge nicht durch ungenügende Methodik verursacht worden waren.Jede korrekte Bestimmung mußte diese Übergänge beinhalten.BEUTLER (7,9,1o) postulierte nämlich jetzt die Existenz eines weiteren Gens für die gt.

1.5 NOMENKLATUR DER PHÄNOTYPEN UND GENOTYPEN DES GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE-POLYMORPHISMUS

Das zusätzlich zu den bisher angenommenen Genen von BEUTLER geforderte Gen nennt er nach dem Entdeckungsort in Kalifornien "Duarte".Das dazugehörige Gen gt^D führt beim Träger zu 25% Enzymaktivität.Heterozygote des Typs Galaktosämie/Duarte (gt^G/gt^D) haben also 25% Enzymaktivität.Für Duarte-Homozygote ergibt sich 5o%,ebensoviel wie für Heterozygote der Genkombination gt^N/gt^G.Diese beiden Typen sind mit der Enzymaktivitätsmessung nicht auseinanderzuhalten.Personen,die den Genotyp gt^N/gt^D aufweisen,besitzen 75% Aktivität.Der Typ gt(G),genotypisch entsprechend gt^G/gt^G,hat o% Aktivität.Zwischen gt(N) und gt(N-D) kann mit dieser These ebenfalls eine Grenze gezogen werden.Phänotyp gt(N) hat 1oo% Enzymaktivität.

Die ursprünglich von BEUTLER vorgegebenen Bezeichnungen für die einzelnen Gene wurden nicht von allen Autoren übernommen.In Tabelle 1 findet sich eine vergleichende Übersicht aller bei verschiedenen Autoren gebrauchten Nomenklaturen.Die in diesem Text benutzte Nomenklatur ist in Tabelle 2 aufgeführt.
Nicht nur die von vielen Untersuchern gefundenen Zwischenformen im Bereich zwischen den Typen gt(N) bis gt(N-G) haben mit der Annahme der Duarte-Variante ihre Erklärung gefunden.Auch der von DONELL (25) beschriebene Fall geringer Enzymaktivität im Bereich zwischen gt(G) und gt(N-G) dürfte nun

erklärlich sein.Wahrscheinlich handelte es sich um den Typ gt(D-G).
Die Zuordnung der zu dieser Zeit enzymatisch zu bestimmenden Phönotypen und Genotypen zeigt Tabelle 3.

AUTOR	BEZEICHNUNG DES GENS						
vorliegende Untersuchung	gt^{LA}	gt^{N}	gt^{I}	gt^{D}	gt^{B}	gt^{R}	gt^{G}
BEUTLER		Gt^{+}		Gt^{D}			gt
BISSBORT,KÜHNL		Gt^{1}		Gt^{2}			
MARTIN		Ut^{1}		Ut^{2}			
MELLMAN		Gt^{+}		Gt^{D}			Gt^{G}
NG,SPARKES	LA	N		D			G
THOMAKOS		$GALT^{A}$		$GALT^{D}$			$GALT^{G}$

TABELLE 1 : Übersicht der von verschiedenen Autoren benutzten Gen-Nomenklaturen.

GENBEZEICHNUNG	NAME DER VARIANTE	AKTIVITÄT DER NORM
gt^{LA}	Los Angeles	über 5o%
gt^{N}	normales Gen	5o%
gt^{I}	Indiana	35%
gt^{D}	Duarte	25%
gt^{B}	Bern	2o%
gt^{R}	Rennes	7-1o%
gt^{G}	Galaktosämie	o%

TABELLE 2 : In dieser Untersuchung angewendete Bezeichnung der Gene mit Zuordnung des Namens und der Aktivität der Variante.Aus den möglichen Genkombinationen gehen die zuzuordnenden Aktivitäten durch Addition der Einzelaktivitäten hervor.

Das Auftreten der Duarte-Variante ist ohne gesundheitliche Folgen für den Träger (1o,67,95).Sogar der Phänotyp gt(D-G) mit nur 25% Enzymaktivität zeigt keine der bei Galaktosämie üblichen Krankheitserscheinungen (54,67). Überhaupt scheinen Krankheitssymptome erst bei weniger als 2o% Enzymaktivität aufzutreten (8o).
Tabelle 3 zeigt die mit der Enzymaktivitätsmessung bestimmbaren gt-Phänotypen.BEUTLER erfaßte mit dem "UDPG-consumption-Test" die Typen gt(N-D), gt(N) und gt(G).Der Phänotyp gt(D) konnte nicht genotypisch in gt^{D}/gt^{D}

und gt^N/gt^G unterteilt werden (12).Lag ein solcher Fall vor,konnte nur eine Familienuntersuchung weiterhelfen.Denn die biochemische Überprüfung des Duarte-Enzymproteins erbrachte keine Unterschiede zum Normal-Protein. So sind pH-Optimum,thermische Stabilität,Substrataffinität,Km-Wert und Enzyminhibition beider Varianten gleich (8,11,57,62).

ENZYMAKTIVITÄT	PHÄNOTYP	MÖGLICHE GENOTYPEN
100%	gt(N)	gt^N/gt^N
75%	gt(N-D)	gt^N/gt^D
50%	gt(D)	gt^N/gt^G,gt^D/gt^D
25%	gt(D-G)	gt^D/gt^G
0%	gt(G)	gt^G/gt^G

TABELLE 3 : Enzymaktivität mit den zuzuordnenden Phäno- und Genotypbezeichnungen.

1.6 ENTDECKUNG VON VARIANTEN MIT DER STÄRKEGELELEKTROPHORESE

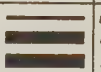
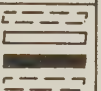
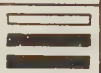
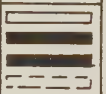
Mit Anwendung der Stärkegelelektrophoresetechnik von MATHAI (57) wird eine Differenzierung von gt(D) und gt(N-G) möglich.Die im ultravioletten Licht sichtbaren Enzymbanden zeigen: Bei Galaktosämie,also Vorliegen von Typ gt(G),keine Banden.

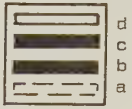
Typ gt(D) hat eine schnellere Bande als der Normaltyp.Die Ursache dafür ist die gegenüber dem Normal-Protein höhere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit des Duarte-Proteins.Macht man das elektrophoretische Bandenmuster zur Grundlage der Festlegung der Phänotypen,so ist beim Phänotyp gt(D) in Tab. 3 nun phänotypisch eindeutig gt(D) von gt(N-G) zu trennen.

Phänotyp gt(D) zeigt die schnelle Bande.gt(N-G) imponiert jetzt in der Elektrophorese phänotypisch wie gt(N),ist aber mit der Enzymaktivitätsmessung zu unterscheiden.

Bei gt(N-D) erscheint eine Bande wie beim Typ gt(N) und zusätzlich eine ganz schwache Bande darüber.Eine Darstellung der verschiedenen Bandenmuster gibt Tabelle 4.

Die unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von N- und D-Enzymen liegt nicht an differierenden Molekulargewichten,die für beide Proteine mit 85.000-90.000 angegeben werden (57,93).DALE (21) gibt abweichend ein Molekulargewicht von 69.000 an.

PHÄNOTYP	MÖGLICHE GENOTYPEN	BEUTLER 1966	NG 1969	BISSBORT 1972	NG 1973	KÜHNL [1] 1974	SPARKES 1977
gt(N)	gt^N/gt^N gt^N/gt^G						
gt(N-D)	gt^N/gt^D						
gt(D)	gt^D/gt^D						
gt(N-LA)	gt^N/gt^{LA}						
gt(LA)	gt^{LA}/gt^{LA} gt^D/gt^{LA} gt^G/gt^{LA}						
gt(D-G)	gt^D/gt^G						



BEISPIEL :
a-Bande schwach
d-Bande mittel
c-Bande kräftig

TABELLE 4 : Mit der Stärkegelelektrophorese festgestellte gt-Enzymbanden verschiedener Untersucher.Die Laufrichtung der Banden ist anodal(hier: von unten nach oben) vorzustellen.Keine Banden zeigt gt(G). 1)Agarosegel.Bandenbezeichnung von unten nach oben: a-,b-,c- und d-Bande.

Obwohl bei Galaktosämie keine Bande darstellbar ist,existiert ein entsprechendes,inaktives Protein.HANSEN (37) weist es mit einem Antikörper auf Kalbslebertransferase nach.TEDESCO (94) findet ebenfalls ein Protein bei Galaktosämischen.DALE (21) bestätigt ein katalytisch inaktives Protein in Erythrozyten eines Galaktosämiepatienten,das immunologische Identität mit der normalen Transferase aufweist.
Die Ergebnisse von BEUTLER werden in der Folgezeit von verschiedenen Untersuchern untermauert (2,38,65,91).GITZELMANN (28) findet zwei Personen mit schneller c-Bande und 25% Enzymaktivität,was für den Typ gt(D-G) spricht.MELLMAN (6o) bestätigt bei einem Duarte-Homozygoten BEUTLERs Beobachtung der schnelleren Enzymmobilität in der Elektrophorese.SCHAPIRA (77) beschreibt für gt(D-G) eine schnelle,lediglich schwach anfärbbare Bande.

BISSBORT (13) stellt in der Stärkegelelektrophorese drei Phänotypen dar, die er Gt 1,Gt 2-1 und Gt 2 benennt.Homozygote Typen haben eine Bande,die Heterozygoten zwei (siehe Tab.4)
Gt 1 und Gt 2 sind autosomale Allele (15,28,6o).Gt 2 soll identisch sein mit gt(D) (15),worauf übrigens auch die auffallend ähnliche Genfrequenz hinweist,die für Gt^2 und gt^D bei ca. o.o6 liegt (4).
Die Duarte-Variante kommt bei allen bis heute untersuchten Populationen vor.Bei einer Indianiden-Stichprobe konnten WEITKAMP&NIEL allerdings überhaupt keine Variante feststellen(97).Beim negriden Rassenkreis tritt die Duarte-Variante seltener auf als beim europiden (95).
1969 führt NG (65) eine andere Stärkegelelektrophoresemethode mit einem Trispuffersystem durch.Eine einzelne b-Bande ergibt sich für den Typ gt(N) (siehe Tab.4).Drei gut getrennte Transferasebanden findet man bei der homozygoten Duarte-Variante,wobei die langsamste eine b-Bande ist. Auch beim Typ gt(N-D) erscheinen drei Banden,doch ist die Verteilung der Färbeintensität hier anders als bei gt(D).Es können nach NG die Phänotypen gt(N),gt(N-D),gt(D) und gt(D-G) bestimmt werden,die bis auf gt(N) mit einem Genotyp übereinstimmen.
1971 entdeckt NG (66) eine neue,keine Krankheitserscheinungen hervorrufende (67) Variante der gt.Er nennt sie "LOS ANGELES"-Variante (LA). Die LA-Variante hat drei Banden,von denen die beiden schnelleren c- und d-Banden eine stärkere Färbeintensität aufweisen als die langsamere b-Bande (siehe Tab.4)(67).Die Homozygoten des Typs gt(LA) haben eine

größere Enzymaktivität als gt(N)-Träger.
Seit Entdeckung der LA-Form ist eine Bestimmung des Genotyps nur noch unter Miteinbeziehung der Elektrophorese möglich.Damit können gt(N-D), gt(N-LA) und gt(D) gut unterschieden werden.Hinter dem Phänotyp gt(N) kann sich sowohl der Genotyp gt^N/gt^N als auch der Genotyp gt^N/gt^G verbergen.Ob bei gt(LA) der Genotyp gt^{LA}/gt^{LA} vorliegt,ist mit Elektrophorese und Aktivitätsmessung nicht zu entscheiden.Hier vermag eine Familienstudie Aufschluß zu bringen.
Die LA-Variante wird zuerst in einer Familienstudie in der Genkombination gt^D/gt^{LA} und gt^G/gt^{LA} bestätigt (2).SPARKES (91) findet ebenfalls LA-Varianten.
Neben gt^D und gt^{LA} wurden noch einige sehr seltene Allele entdeckt. Bei zwei Geschwistern mit klinischer Galaktosämie lag ein elektrophoretisch anormal langsam wanderndes Enzymprotein vor (76).Die Aktivitätsbestimmung im UDPG-Test nachBEUTLER erbrachte nur minimalste Enzymaktivität.Dieser Typ wurde "Rennes"-Variante genannt.HAMMERSEN (33) bestätigte in einem Fall diese Variante und maß 1o% der normalen Enzymaktivität.
Die Eltern des Probanden zeigten in der Elektrophorese keine Auffälligkeiten,obgleich die Mutter nur 6o%,der Vater 35% Transferase-Aktivität besaß.
1971 wurde das Repertoir der Allele um die "Indiana"-Variante (I) erweitert.CHACKO (19)entdeckte bei einem achtzehn Monate alten Mädchen, bei dem Galaktosämie diagnostiziert worden war,eine lagerungsunstabile gt-Variante.Im Vergleich zu gt aus Normaltyp-Erythrozyten wies die I-Variante nur 3% Aktivität auf.Bei Mutter und Großmutter wurde eine langsamer wandernde Bande in der Elektrophorese nach MATHAI festgestellt. Die Probandin selbst zeigte keine Bande,möglicherweise wegen Inaktivierung während der Ausführung der Elektrophorese.Das pH-Optimum liegt im für gt üblichen Bereich.
1976 kommt aus der Schweiz der Bericht über eine bis dahin unbekannte Variante (8o).Ohne Anzeichen für einen gestörten Galaktosemetabolismus Hat die "Bern"-Variante (B) in ihrer heterozygoten Form gt(N-B)ca.5o% der normalen Aktivität.Zum Vergleich sei erwähnt,daß in dieser Untersuchung für den Typ gt(N-D) außergewöhnlicherweise 53% Enzymaktivität ge-

messen wurden.Bei anderen Autoren wird für gt(N-D) stets 75% Aktivität angegeben.
In der Agarosegelelektrophorese nach KÜHNL (5o) zeigte sich eine langsamere elektrophoretische Mobilität als bei gt(N).
Identität mit der Indiana- oder Rennes-Variante wurde ausgeschlossen.

Mit anderen Methoden wurden keine weiteren Formen des gt-Polymorphismus gefunden.KÜHNL (5o) diagnostiziert in der Agarosegelelektrophorese die Typen Gt 1,Gt 2,und Gt 2-1.Mit der Säulenchromatographie wird gt(N) und gt(D) gefunden (85).Auch vermittels der Isoelektrischen Fokussierung ist in den bisher verwendeten pH-Bereichen keine Subtypisierung möglich gewesen (51).

1.7 FESTSTELLUNG VON ENZYMAKTIVITÄT AUSSERHALB ERYTHROZYTEN

Enzymaktivität wurde nicht nur in Erythrozyten festgestellt.In der Linse (53),fetalen Erythrocyten (32),Leukozyten (59,78,83,96),Fibroblasten (26,62,79,83),Intestinalmukosa (32,83),Leber (83),Amnionzellen (27,32,62), Haarwurzeln (22),Leber,Lunge,Milz,Niere,Herzmuskel und Gehirn eines Feten (86),Leber,Herz,Niere (2o) und Fibroblasten (34) von Leichen wurde bis heute Transferase-Aktivität gemessen.
Bandenmuster erhielt man von fetalen Erythrozyten (32),Leukozyten (67), Fibroblasten (34),Intstinalmukosa (32),Amnionzellen (32),sowie Leber, Herz und Niere von Leichen (2o).Mit der Isoelektrischen Fokussierung gelang der gt-Nachweis in Leukozyten,Retikulozyten,Leber,Niere,Fibroblasten und auch in der Placenta (78)(siehe Tab.5).
Die Aktivitätsmessungen zeigten durchweg erniedrigte Werte bei Galaktosämie.
Bei einigen Negroiden,die heterozygot gt(N-G) waren,fanden sich normale Leukozytenwerte,aber verminderte Erythrozytenaktivität (59).
Nach HAMMERSEN (32) ist pränatal die Transferaseaktivität gleich der postnatalen,andererseits wurde bei Neugeborenen eine 1o% höhere Aktivität als bei Erwachsenen gefunden (86).Die Transferase-Level schwanken auch je nach untersuchtem Organ.So war bei einem Probanden des Typs gt(D-G) die Aktivität der Fibroblasten auf 1/1o erniedrigt.Aus Fibroblasten gelang aber der Nachweis von gt(N-D) und gt(G) (26,79).
Im Zymogramm fanden sich für Leukozyten andere Banden als für Erythrozyten.

UNTERSUCHTES GEWEBE	ENZYMNACHWEIS	ENZYMNACHWEIS MIT ISOTOPEN	ENZYMAKTIVITÄTS-MESSUNG	STÄRKEGEL-ELEKTROPHORESE	ELEKTRO-FOKUSSIERUNG
Amnionzellen		27	32,62	32	
Fetale Organe			86		
fet.Erythrozyten			32	32	
Fibroblasten			26,62,79,83	34	78
Haarwurzeln		22			
Intest.Mukosa			32,83	32	
Leber			83		78
Leichenfibroblast.			77		
Leichenherz,			2o	2o	
-leber u. -niere					
Leukozyten		96	59,78,83	67	78
Niere					78
Placenta					78
Retikulozyten					78
Linse	53				

TABELLE 5 : Alle mit Erfolg auf das Vorhandensein von gt untersuchten Gewebe -außer Erythrozyten- nach Untersuchungsmethode geordnet.Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis.

NG (67) stellt den Typ gt(N) mit drei Banden und gt(LA) mit zwei Banden dar.
Leber hat ein Muster ähnlich den Erythrozyten,Herz und Niere haben zwei Banden.Bei Verlängerung der Laufzeit konnten fünf Banden für Nieren-homogenisate gezeigt werden (2o).
Hautfibroblasten haben beim Typ gt (N) vier Banden,im Falle von gt(N-D) drei,wobei die D-Komponente schneller läuft,analog dem D-Enzymprotein aus Erythrozyten.
Die Isoelektrische Fokussierung ergibt für Erythrozyten drei Banden, Leber zeigt sechs.Niere und Placenta liefern in abgeschwächter Form Banden ähnlich denen der Leber.

1.8 CHROMOSOMALE LOKALISATION DER ALLELE

Die Allele gt^N,gt^D,gt^{LA} und gt^G werden autosomal kodominant vererbt (71).
Bis heute ist die chromosomale Lokalisation der Gene umstritten.MOHANDAS (61) legte nach Untersuchungen an chinesischen Hamster-Mensch-Zellhybriden den gt-Locus auf Chromosom 9 fest.SUN (92) kommt mit ähnlichen Versuchen zum Schluß,daß der gt-Genort auf Chromosom A2 liegt.Er erwähnt aber,andere Autoren hätten nach Versuchen mit Maus-Mensch-Zellhybriden als Träger-chromosom A3 angegeben.
Als Ursache für die verschiedenen Allele wird eine Punktmutation im Strukturgen angenommen (21,93,94).Beim G-Protein wird das Enzym struk-turell verändert,wahrscheinlich nahe dem katalytischen Zentrum.Das D-Enzym erfährt eine teilweise Behinderung des aktiven Zentrums (62).

1.9. ZUSAMMENSTELLUNG ALLER METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE

Die erste Methode zur Feststellung des Phänptyps der gt wurde 1955 von HOLZEL (4o) durchgeführt,der orale Galaktose-Toleranz-Test.Die gleiche Methode wendet DONELL (24) an.
KALCKAR (46) mißt die Galaktose-1-Phosphat-Akkumulation,die als Indikator für den gestörten Stoffwechsel angesehen wird.Für Heterozygote ergibt sich hier das gleiche Bild wie für Normale.In einem ähnlichen Verfahren bestimmt ROBINSON (74) mit radioaktiv markierter Galaktose die UDP-Galaktose, Galaktose-1-Phosphat und Galaktose in vitro aus Erythrozyten.Anhand der

unterschiedlichen Anhäufungsprofile lassen sich neben Normalen und Galaktosämischen auch heterozygote Personen herausfinden.Über die quantitative Messung der gebildeten Glukose-1-Phosphat bei Inkubation des aus Erythrozytenlysat gewonnenen Enzymes mit Galaktose-1-Phosphat und Uridyldiphosphoglukose kann SCHUTGENS (81) die drei Formen nachweisen.

Der UDPG-Verbrauchs-Test wurde von ANDERSON (1) im Jahre 1957 entwickelt. Er wird an Erythrozyten ausgeführt.Die Menge an UDP-Glukose,die nach der Inkubationszeit noch zurückbleibt,wird spektrophotometrisch gemessen.Der meßbare Farbkomplex entsteht bei der Reduktion von NAD in Gegenwart zugegebener UDP-Glukose-Dehydrogenase.

In einer Abwandlung der o.g. Ausführung des UDPG-Verbrauchs-Test wird mit C^{14}-Isotop markierte UDP-Galaktose gemessen,die aus C^{14}-gekennzeichneter Galaktose-1-Phosphat entstanden ist.

Verbessert wurde der UDPG-Test in vielen Details.MAXWELL (58) mißt zusätzlich UDP-Galaktose,die bei der Inkubation entsteht.BRETTHAUER (17) verringert durch höhere UDP-Glukose-Konzentration die notwendige Hämolysatmenge und kommt mit einer kürzeren Inkubationszeit aus.Mußten bei den bisher genannten Methoden noch Spezialspektrophotometer verwendet werden,so brachte die Einführung von Thionikotinamiddiphosphopyridin-Nukleotid (TNDPN) anstelle von NAD die Möglichkeit wegen eines günstigeren Absorptionsmaximums Standardspektrophotometer zu benutzen (68).Durch Zugabe von Clelands Reagenz zu Erythrozyten und Leukozyten gelingt MELLMAN (59) die Wiederherstellung von durch Lagerung und Alterung verminderten Enzymaktivitäten.Der Effekt beruht auf einer vollständigen Reduzierung der Sulfhydrilgruppen. BEUTLER (12) benutzt statt Aqua dest. eine physiologische Kochsalzlösung.

Der UDPG-Assay mit C^{14}-Isotopen wurde von NG (63) erstmals ausgeführt und später durch die chromatographische Auftrennung der C^{14}-markierten Nukleotide verbessert.BEUTLER differenziert mit dem UDPG-Test präzise zwischen gt(N),gt(N-G),gt(N-D) und gt(G) (7,12).

DE BRUYN (23) vergleicht beide UDPG-Testmethoden und findet im Falle eines galaktosämischen Neugeborenen mit dem photometrischen Test 25% der Normaktivität,im radioaktiven Assay nur 1%.Weil bei Neugeborenen die NADase noch nicht in den Erythrozyten aktiv ist,kann NAD die UDP-Galaktose-4-Epimerase aktivieren.Dieses Enzym vermag den UDPG-Ver-

brauchs-Test zu stören,da es ebenfalls UDP-Glukose verbraucht.Es ergibt sich dann ein UDP-Glukose-Verbrauch,obgleich die gt-Aktivität fehlt.
KIRKMAN (49) mißt die Enzymaktivität der gt anhand der Sauerstoffaufnahme in Mikroliter pro Stunde für o.3ml zentrifugiertes Hämolysat.Die Oxydation von Galaktose-1-C^{14} zu $C^{14}O_2$ aus Vollblut dient WEINBERG (96) zur Aktivitätsmessung;er kann dabei auch heterozygote gt(N-G) erfassen.

Mit Vollblutproben arbeitet BREWER (18).Das Hämoglobin der Probe wird durch Mischen mit Natriumnitrit zu Methämoglobin.Nach Zugabe von Galaktose können galaktosämische Erythrozyten das Methämoglobin nicht reduzieren,da sie im Gegensatz zu normalen Blutzellen Galaktose nicht als Energiequelle verbrauchen können.Heterozygote entdeckt der Test nicht.

Durch Überführung von Methylenblau in seine Leukoform stellt BEUTLER (9) die gt-Aktivität dar.Als Parameter gilt die Entfärbungszeit.Die verbesserte Form,die ohne Anaerobität auskommt und durch Einsatz von Triphosphopyridin-Nukleotid (TPN) als Elektronenrezeptor sich bei langwelligem UV-Licht ablesen läßt,ist heutzutage weit verbreitet als BEUTLER-Test (9).Alle nicht N-Typen haben eine verlängerte Anfärbezeit.

Mit der Säulenchromatographie und radioaktiv markierter UDP-Galaktose läßt sich gt(N) und gt(D) bestimmen (85).
Mit nur 25 Mikroliter Hämolysat bestimmt PESCE (7o) in einem mikrospektrophotometrischen Assay gt(N) und Galaktosämie-Träger.
Die Elektrophorese wurde zum gt-Nachweis zum ersten Mal von MATHAI (57) angewandt.Elektrophorese nennt man die Bewegung geladener Partikel in einer Lösung unter Einfluß eines äußeren,elektrischen Feldes.Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen hängt dabei ab von der anliegenden Feldstärke,der Ladung der Partikel und ihrer Reibung im Lösungsmittel.Diese wird bestimmt von der Größe der Teilchen und der Viskosität des Mediums (16).
Die in diesem Verfahren gelaufenen Enzymfraktionen werden bei der gt zur Sichtbarmachung einer Färbung unterzogen.Das Prinzip dieser Färbung soll kurz beschrieben werden: In Gegenwart von gt entsteht aus UDPG und Galaktose-1-Phosphat UDP-Galaktose und Glukose-1-Phosphat.Glukose-1-

Phosphat wird in Anwesenheit von Phosphogluko-Mutase (PGM) zu Glukose-6-Phosphat.Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert dieses zu 6-Phospho-Glukose.Dem Reaktionsprodukt wird also Wasserstoff durch die Dehydrogenase entzogen.Je zwei entzogene Wasserstoffatome verbinden sich mit $NADP^+$. Der eigentliche Anfärbeeffekt kommt dadurch zustande,daß $NADPH_2$ Tetrazolium-salze wie hier MTT zu roten oder blauen,unlöslichen Formazanfarbstoffen reduziert.Zwischen $NADPH_2$ und MTT ist noch Phenazin-Methosulfat (PMS) eingeschaltet,eine Substanz,die reversibel Elektronen aufnehmen und abgeben kann (57).
MATHAIs Elektrophoreseverfahren beruht auf der vertikalen Stärkegel-elektrophorese nach SMITHIES (9o).MATHAI benutzt 13,16 und 2o% Stärke-gele.Der Puffer ist o.ooSM Kaliumphophat.Die Elektrophorese läuft 16 h bei 4V/cm.Statt wie oben beschrieben wird bei der hier angegebenen Färbe-methode statt $NADP^+$ noch TPN reduziert.Reduziertes TPN ist in UV-Licht fluorescierend.
GITZELMANN (28) führt diese Methode als horizontale Elektrophorese aus, wie auch SCHAPIRA (76),die dem Gel noch o.o1 M ß-Mercaptoäthanol zusetzt.

NG (6ℰ) führt ein Tris-Puffer-System ein.Allen bisher genannten Elektro-phoresemethoden ist gemeinsam,daß sie zur Sichtbarmachung der Enzym-banden UV-Licht benötigen.BISSBORT (14) stellt 1973 die gt-Banden zum erstenmal mit der oben bereits beschriebenen Formazan-Färbung dar.

Ebenfalls ein Tris-Puffer-System und die Formazan-Färbung benutzt KÜHNL (5o).Statt Stärkegel verwendet er 1% Agarosegel.Die Laufzeit beträgt nur 9o Minuten.Zur Darstellung werden die Typen Gt 1,Gt 2 und Gt 2-1 ge-bracht (siehe Tab.4).
Die Isoelektrische Fokussierung hat zur Unterscheidung der Banden keinen Fortschritt gebracht.In diesem Verfahren konnten bisher nicht mehr als die bereits bekannten Banden für erythrozytäre gt aufgezeigt werden(78).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 BLUTPROBEN

Die Blutproben wurden durch Venenpunktion gewonnen.Der Blutkuchen wird anschließend mechanisch durch feinmaschige Siebe zerkleinert.Es folgt dreimaliges Waschen des Sedimentes mit dem fünffachen Probevolumen an physiologischer Kochsalzlösung und vierminütiges Zentrifugieren bei 1ooog. Die Blutproben werden dann in einer Tiefkühltruhe bei -2oC eingefroren.

Bis zum Auftauen des Hämolysates können sie so gelagert werden.

2.2 AUFBEREITUNG DER HÄMOLYSATE ZUR ELEKTROPHORESE

Eine Stunde vor Verwendung zur Elektrophorese wird das Hämolysat aufgetaut.Nach vollständigem Auftauen wird die gleiche Volumenmenge Toluol zugesetzt.Das Hämolysat wird mit dem Toluol 12o sek. geschüttelt.Nach 2o Minuten Zentrifugieren bei 1ooog wird der Toluolüberstand abgesaugt. Der Überstand wird verworfen.Es bleibt nur stromafreies Hämolysat zurück. In dieses Hämolysat wird ein Filterpapierplättchen der Abmessung o.5xo.6mm (Schleicher und Schüll No.2668) kurz eingetaucht,auf Filterpapier abgetupft und in das Gel an der Startlinie eingesetzt.

2.3 ZUSAMMENSETZUNG VON ELEKTROPHORESEGEL UND -PUFFER

Das Elektrophoresegel wird aus 6og Stärke (Serva No. 35 37o) und 5ooml auf 1:1o verdünnten Kammerpuffer gekocht.In einer Kunststoffkammer wird das Gel zu einer 8 mm dicken Schicht auf eine Glasplatte der Abmessung 25x21 cm ausgegossen.An den Längsseiten hat das Gel Kontakt mit Filterpapierstreifen,die die Verbindung zur Pufferkammer herstellen (siehe auch Schnittzeichnung).Das Gel wird bis zur Erstarrung bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit einer Plastikfolie abgedeckt bei 4C im Kühlschrank 3 h aufbewahrt.
In die Gelplatte werden an der Startlinie,die vier Zentimeter vom Rand der Gelkammer entfernt liegt,zwanzig Schlitze von o.5 cm Breite parallel zur Längsseite verlaufend eingestanzt.In diese werden die hämolysatgetränkten Filterpapierplättchen unmittelbar vor Beginn der Elektrophorese eingesetzt.Die Gelträgerkammer wird in die Pufferkammer so eingesetzt,daß sich die Proben an der Kathodenseite befinden.

Wird nun Spannung angelegt,wandert das Enzym anodenwärts.

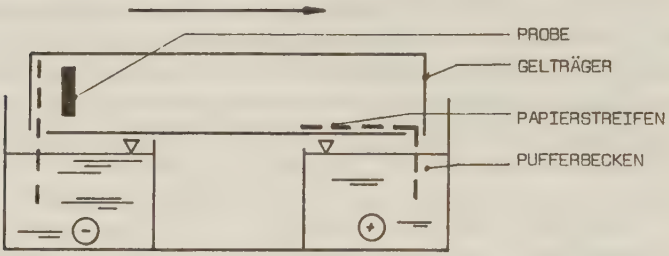


ABBILDUNG 1 : Schnittzeichnung der Gelträger- und Pufferkammer.

Die Anoden- und Kathoden-Pufferbecken enthalten jeweils 75o ml Kammerpuffer.Dieser besteht aus:

o.1 M DL-Histidin HCl (Sigma H 7875)
o.oo4 M EDTA (Serva 1128o)
o.15 M Tris (Merck 8 382)

Die Laufzeit der horizontal ausgeführten Elektrophorese beträgt 18 Stunden bei 7.5V/cm.Die Temperatur beträgt 4C.Damit sich durch Austrocknung keine Risse im Gel bilden,wird es während der gesamten Laufzeit mit einer Plastikfolie abgedeckt.

2.4 ANFÄRBUNG

Nach Beendigung der Laufzeit wird die Gelkammer aus der Pufferkammer herausgehoben.Von der Gelplatte wird an beiden Längsseiten ein vier Zentimeter breiter Streifen abgeschnitten und verworfen.Das verbleibende Mittelstück wird in zwei Schichten zerschnitten.Eine Schicht wird auf der Schnittfläche mit der Färbelösung übergossen.Aus praktischen Gründen ist das Anfärben der unteren Schicht zu empfehlen,da die obere Schicht beim Abheben leicht einreißt.
Die verwendete Färbelösung enthält folgende in der angegebenen Reihenfolge zusammenzugebenden Bestandteile:

1o ml o.3 M Tris mit Eisessig auf pH 7.8 eingestellt
2o mg Galaktose-1-Phosphat als K_2-Salz
15 mg UDP-Glukose als Na_2-Salz

1o mg NADP Na_2-Salz
o.2mg Glukose-1.6-Diphosphat
o.o25 ml Phophogluko-Mutase 4ooU/ml
o.o5 ml Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase 14oU/ml
1ml o.2 M $MgCl_2$
2ml MTT 1mg/ml
1ml PMS 1mg/ml

Diese Mixtur gibt man zu 18 ml 2% Agaroselösung von 5oC vorsichtig an der Wandung des Glases hinablaufend,da Blasenbildung unbedingt vermieden werden muß.Auch beim Mischen ist aus diesem Grunde vorsichtig umzuschwenken.

Kurz vor dem Erkalten wird die Agarose-Färbelösung gleichmäßig über die Oberfläche der zu färbenden Stärkegelschicht gegossen.Nach etwa 9o Minuten bei 37C im Inkubator zeigen sich die bereits beschriebenen Banden in blauer Anfärbung.

3. ERGEBNISSE

3.1 BESCHREIBUNG DER SECHS IN DER STÄRKEGELELEKTROPHORESE NACHGEWIESENEN GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE-PHÄNOTYPENBANDENMUSTER

Mit der verwendeten Stärkegelelektrophorese konnten in dieser Untersuchung sechs Phänotypen der gt dargestellt werden (siehe Abb. 2).

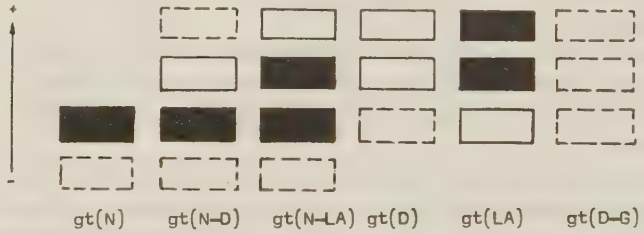


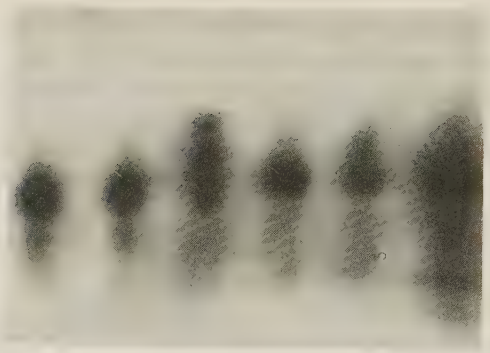
ABBILDUNG 2 : Schematische Darstellung der Bandenmuster der sechs gt-Phänotypen in der Stärkegelelektrophorese.

Der Phänotyp gt(N) ist der häufigste.Bei ihm findet sich eine kräftig angefärbte b-Bande.Darunter,also kathodenwärts,liegt eine weitere fast immer sehr schwache Bande,die a-Bande (siehe Abb. 3-6).
Unterhalb dieser konnte öfter noch eine weitere sehr schwache Bande gesehen werden (Abb.3).Wir bezeichnen sie als "sub-a-Bande",kurz s-Bande.
Eine sehr starke a-Bande mit ausgeprägter s-Bande fanden wir auch bei 22 Blutproben mit dem Phänotyp gt(N) von bolivianischen Indianern.

Der Phänotyp gt(N-D) besitzt wie gt(N) eine schwache a-Bande und eine stark ausgeprägte b-Bande.Über der b-Bande ist eine Bande von mittlerer Intensität zu finden,die c-Bande.Die am schnellsten wandernde d-Bande ist gleich schwach wie die a-Bande (siehe Abb.3-6).
Die a- und b-Banden des Typs gt(N-LA) unterscheiden sich in der Intensität nicht von denen des Typs gt(N).Jedoch stellt sich bei gt(N-LA) die c-Bande in gleicher Intensität wie die b-Bande dar.Weiter anodenwärts findet sich die d-Fraktion.Sie hat eine im Vergleich zur b- und c-Bande sichtlich abgeschwächte Anfärbung (siehe Abb.3 u.6).

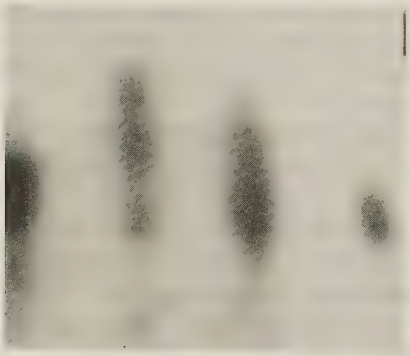
Eine b-Bande von geringer Anfärbbarkeit tritt bei Phänotyp gt(D) auf. Die c- und d-Banden haben eine mittelstarke Anfärbung.
Phänotyp gt(LA) zeigt ein dem Phänotyp gt(D) ähnliches Bild.Es liegen gleichfalls einander in der Anfärbeintensität gleiche c- und d-Banden vor.Es hat aber die b-Bande schon mittlere Anfärbestärke,und die c- und d-Banden sind kräftig angefärbt.Der Typ gt(LA) ist in Abb.4 dargestellt.

Der sehr seltene Phänotyp gt(D-G) hat drei sehr schwache Banden,nämlich b,c und d.(siehe Abb.6)
Die sechs Phänotypen gliedern sich in einen Phänotyp mit zwei Banden, zwei Typen mit je vier Banden und drei Typen mit je drei Banden.Keine Differenzierungsschwierigkeiten macht der Typ mit zwei Banden.Es handelt sich immer um den Phänotyp gt(N).
Sobald c- oder d-Banden sichtbar sind,liegt mit Sicherheit kein Normaltyp vor.Beim Phänotyp gt(N-D) und beim Typ gt(N-LA),deren Bandenmuster sich durch je vier Einzelbanden auszeichnen,ist eine Unterscheidung einfach möglich.Die a- und b-Banden sind bei beiden gleich.Bei gt(N-LA) stellt sich aber im Gegensatz zu gt(N-D) keine Intensitätsabstufung in der Anfärbung von der b- zur c-Bande ein.Bei gt(N-D) ist zudem die d-Bande schwächer,höchstenfalls aber gleich stark wie die a-Bande zu sehen.Phänotyp gt(N-LA) besitzt dagegen eine d-Bande,die in jedem Fall stärker angefärbt erscheint als die a-Bande.
Aus der Gruppe der Phänotypen mit drei Banden läßt sich am einfachsten der Typ gt(D-G) aussondern.Er hat drei gleichmäßig schwach angefärbte Banden.
Demgegenüber haben die Phänotypen gt(D) und gt(LA) je eine schwache a-Bande und im Verhältnis dazu kräftiger angefärbte b- und c-Banden. Aufgrund der relativen Farbabstufung ihrer Banden können sie nicht unterschieden werden.Der Typ gt(LA) ist nur durch die insgesamt viel stärkere Anfärbung von gt(D) zu unterscheiden.Im Vergleich mit der stark ausgeprägten b-Bande eines gt(N)-Typs hat gt(LA) gleich starke c- und d-Banden.Bei gt(D) sind die c- und d-Banden stets schwächer als die b-Bande eines gt(N)-Typs.
Die sechs Phänotypen sind auf den folgenden Abbildungen 3-6 zu sehen. Es handelt sich um Aufnahmen von angefärbten Gelplatten.



1 1 4 1 2 1

ABBILDUNG 3 : gt(N)= 1;gt(N-D)= 2;gt(N-LA)= 4

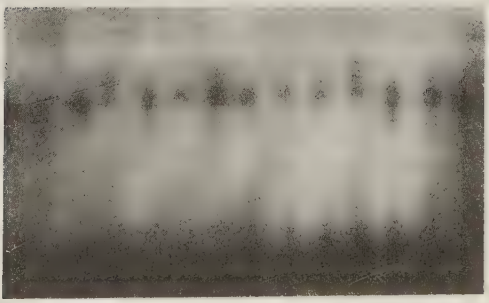


1 5 2 1

ABBILDUNG 4 : gt(N)= 1;gt(N-D)= 2;gt(LA)= 5

1 2 3 2 1 1

ABBILDUNG 5 : gt(N)= 1;gt(N-D)= 2;gt(D)= 3



6 2 4

ABBILDUNG 6 : gt(N-D)= 2;gt(N-LA)= 4;gt(D-G)= 6

3.2 GENFREQUENZEN DER UNTERSUCHTEN BEVÖLKERUNGSSTICHPROBE AUS NORDRHEINWESTFALEN

Der untersuchte Stichprobenumfang betrug n = 727 unverwandte,nicht ausgewählte Personen aus Nordrheinwestfalen.Der überwiegende Teil der untersuchten Individuen ist in Düsseldorf und den umliegenden Städten ansässig.

Die beobachteten Phänotyphäufigkeiten sind zum Vergleich mit den zu erwartenden Phänotyphäufigkeiten in den Tabellen 6 und 7 zusammengestellt.

PHÄNOTYP	n BEOBACHTET	n ERWARTET	DIFFERENZ
gt(N)	644	64o.7	+ 3.3
gt(N-D)	46	5o	- 4
gt(D)	2	2	o
gt(N-LA)	31	32	- 1
gt(LA)	3	1	+ 2
gt(D-G)	(1)		

TABELLE 6 : Vergleichende Aufstellung der beobachteten und zu erwartenden Phänotyphäufigkeiten.

PHÄNOTYP	% BEOBACHTET	% ERWARTET	DIFFERENZ
gt(N)	88.6	88.3	+ o.3
gt(N-D)	6.3	6.9	- o.6
gt(D)	o.3	o.3	o
gt(N-LA)	4.3	4.4	- o.1
gt(LA)	o.4	o.1	+ o.3
gt(D-G)	(o.1)		

TABELLE 7 : Vergleichende Aufstellung der beobachteten und zu erwartenden Phänotyphäufigkeiten.

Das Gen gt^G,das nur einmal beim Phänotyp gt(D-G) auftrat,wurde bei den Berechnungen der Genfrequenzen vernachlässigt.Die Genfrequenzen wurden wie folgt berechnet:

$$f\,(gt^{N}) = \frac{2n\ gt(N) + n\ gt(N\text{-}D) + n\ gt(N\text{-}LA)}{2n\ gesamt}$$

$$f\,(gt^{D}) = \frac{2n\ gt(D) + n\ gt(N\text{-}D) + n\ gt(LA)}{2n\ gesamt}$$

$$f\,(gt^{LA}) = \frac{n\ gt(N\text{-}LA) + n\ gt(LA)}{2n\ gesamt}$$

Die daraus errechneten Genfrequenzen betragen :

$$f\,(gt^{N}) = 0.9388$$
$$f\,(gt^{D}) = 0.0366$$
$$f\,(gt^{LA}) = 0.0234$$

Die gefundenen Genfrequenzen liegen in guter Übereinstimmung mit den nach dem HARDY-WEINBERG-Gesetz zu erwartenden Zahlen. Die zu erwartenden Phänotyphäufigkeiten weichen von den tatsächlich gefundenen in keinem Fall um mehr als 0.6% ab.Es ergibt sich ein chi-quadrat-Wert nach BRANDT-SNEDECOR (75) von 1.191.
Auch beim Vergleich der gefundenen Verteilung getrennt nach Frauen und Männern ist kein signifikanter Unterschied ersichtlich.Es errechnet sich ein chi-quadrat-Wert von 1.52.Beide Mengen entstammen der gleichen Grundgesamtheit.

3.3 MUTTER-KIND-KOMBINATIONEN

Unter 81 untersuchten Mutter-Kind-Kombinationen fand sich kein widersprüchlicher Fall zu dem angenommenen Modell der drei autosomal kodominant vererbten Allele an einem Locus.
Eine Übersicht aller gefundenen Kombinationen gibt Tabelle 8.

3.4 VERWENDUNG DES POLYMORPHISMUS DER GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE IN DER ABSTAMMUNGSBEGUTACHTUNG

Durch Aufsplittung des seltenen Allels Gt^{2} in die Allele gt^{D} und gt^{LA} kann die Vaterschaftsausschlußchance geringfügig erhöht werden.Im Einzelfall ist die Unterscheidung oft hilfreich.Sie kann einen ein-

KINDES-MUTTER / KIND	gt(N)	gt(N-D)	gt(N-LA)	gt(D)	gt(LA)	SUMME
gt(N)	66	1	1	-	-	68
gt(N-D)	1	2	-	-	-	3
gt(N-LA)	2	1	4	-	-	7
gt(D)	-	1	-	-	-	1
gt(LA)	-	-	1	1	-	2
SUMME	69	5	6	1	-	81

TABELLE 8 : Übersicht der gefundenen Phänotypkombinationen bei 81 untersuchten Mutter-Kind-Kombinationen.

deutigen Ausschluß von der Vaterschaft anzeigen. Zum anderen steigt die Wahrscheinlichkeit, daß ein Mann der leibliche Vater eines Kindes ist, wenn beide Träger des seltenen Allels sind.
Die Tabelle 9 zeigt, bei welcher Mutter-Kind-Kombination welche Männer aufgrund ihres gt-Phänotyps ausgeschlossen werden können.*)

PHÄNOTYP DES KINDES	PHÄNOTYP DER KINDESMUTTER	PHÄNOTYP AUSZUSCHLIESSENDER MÄNNER
gt(N)	gt(N)	gt(D),gt(LA)
	gt(N-D)	gt(D),gt(LA)
	gt(N-LA)	gt(D),gt(LA)
gt(N-D)	gt(N)	gt(N),gt(N-LA)
	gt(N-D)	-
	gt(D)	gt(D),gt(LA)
	gt(N-LA)	gt(N),gt(N-LA)
gt(D)	gt(N-D)	gt(N),gt(N-LA)
	gt(D)	gt(N),gt(N-LA)
gt(N-LA)	gt(N)	gt(N),gt(N-D),gt(D)
	gt(N-D)	gt(N),gt(N-D),gt(D)
	gt(N-LA)	gt(D)
	gt(LA)	gt(D),gt(LA)
gt(LA)	gt(N-D)	gt(N),gt(N-D),gt(D)
	gt(D)	gt(N),gt(N-D),gt(D)
	gt(N-LA)	gt(N)
	gt(LA)	gt(N)

TABELLE 9 : Zusammenstellung von Mutter-Kind-Kombinationen und den jeweils ausschließbaren Männern.*)

In den drei folgenden Falldarstellungen soll die Verwendungsmöglichkeit des gt-Isoenzymsystems in der Abstammungsbegutachtung kurz skizziert werden.

*) Unter Vernachlässigung des "stummen" Allels gt^G (=Gt^d)

FALLDARSTELLUNG 1 :

Beteiligte: Kind,Kindesmutter,Praesumptivvater

Bei allen Beteiligten wurden neun Erythrozytenmembransysteme (ABO, MNSs,Lutheran,Colton,Rhesus,Kell,Duffy,P und Kidd) in die Untersuchung miteinbezogen.Ferner wurden die Plasmaproteinsysteme Ag,C'3, Hp,Gc,Gm und Km sowie die Isoenzymsysteme acP,PGM_1,ADA,GPT und ESD betrachtet.

In allen diesen Systemen ergab sich kein Ausschluß des Mannes von der Vaterschaft.Es stellte sich heraus,daß der Beklagte nur mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als o.o2 % zum Kollektiv der möglichen Väter gehörte,aber mit 96 % Wahrscheinlichkeit zur Gruppe der nicht ausschließbaren Nichtväter.Die ESSEN-MÖLLER-Wahrscheinlichkeit betrug W = 47,5 %.

In einer weiteren Untersuchung wurde das HLA-System mitberücksichtigt. Es ergab sich ein isolierter Ausschluß.

Im gt-Isoenzymsystem fand sich zusätzlich eine klassische Ausschlußkonstellation (siehe Abb.7).Die Kindesmutter und der Mann hatten den Phänotyp gt(N),das Kind gt(N-LA).Da der Präsumptivvater das geforderte Allel gt^{LA} nicht aufweist,kann er ausgeschlossen werden.

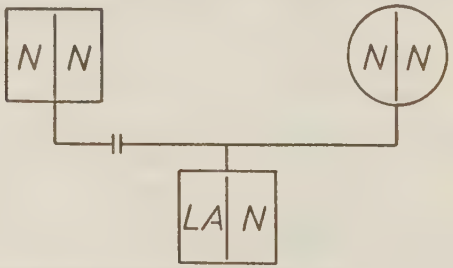


ABBILDUNG 7 : Stammbaum zu Falldarstellung 1

FALLDARSTELLUNG 2 :

Beteiligte: Kind,Kindesmutter,Präsumptivvater

Bei allen Personen wurden 2o Blutgruppensysteme untersucht.Für den Präsumptivvater errechnete sich eine statistische Plausibilität nach ESSEN-MÖLLER von W = 99,45 %.

Im gt-Isoenzymsystem zeigte die Kindesmutter den Phänotyp gt(N-LA),

der Präsumptivvater gt(N-D).Das Kind besaß den Phänotyp gt(LA). Diesem Phänotyp können -wie oben erwähnt- mehrere Genotypen zugrunde liegen.

Geht man von der Vaterschaft dieses Mannes aus,so liegt hier ein Beispiel einer Familienuntersuchung vor,in der dem Phänotyp gt(LA) der Genotyp gt^{D}/gt^{LA} zugrunde liegt.

Es muß aber auch an die Möglichkeit gedacht werden,daß dem Kind ein anderer Genotyp eigen ist,nämlich gt^{LA}/gt^{LA}.Dies würde einen Ausschluß bedeuten (Abb. 8).

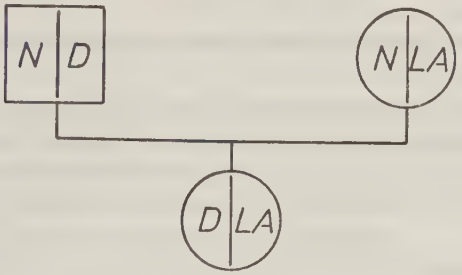


ABBILDUNG 8 : Stammbaum zu Falldarstellung 2

FALLDARSTELLUNG 3 :

Beteiligte: Kind,Kindesmutter,Präsumptivvater

Es wurden bei allen Beteiligten 19 Blutgruppenmerkmale untersucht. Der Mann wies eine statistische Plausibilität für die Vaterschaft von W = 99,89 % auf.

Kindesmutter und Vater zeigten im gt-Isoenzymsystem den Phänotyp gt(N-D).Das Kind besaß den Phänotyp gt(D),womit sein Genotyp als gt^{D}/gt^{D} anzusehen ist.

Die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft dieses Mannes steigt bei dieser Konstellation,da der Vater und das Kind das seltene Allel tragen (siehe Abb.9).

In 48 Fällen strittiger Vaterschaft,in denen die statistische Plausibilität für die Vaterschaft des Betreffenden sprach,ergab sich im gt-Isoenzymsystem keine Konstellation,die einen Ausschluß bedeutet hätte.

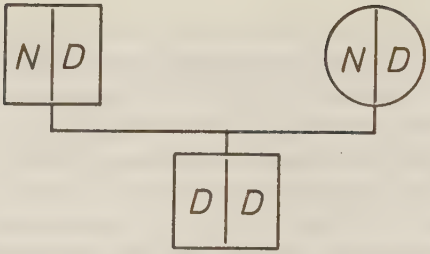


ABBILDUNG 9 : Stammbaum zu Falldarstellung 3

3.5 EINFLUSS VON ALTERUNG UND LAGERUNGSBEDINGUNGEN DER BLUTPROBEN AUF DAS ZYMOGRAMM

Die Zymogramme von in einwöchigen Intervallen untersuchten Proben ließen eine unveränderte Reproduzierbarkeit der Bandenmuster über einen Zeitraum von vier Wochen erkennen.Innerhalb dieser vier Wochen wurden keine "Transformationen" beobachtet,d.h.die Typen gt(N-D) oder gt(N-LA) u.s.w. erschienen unter allen geprüften Bedingungen der Lagerung und Bearbeitung wieder als solche (vgl. HENKE (39)).Es spielte dabei offenbar keine Rolle,ob die Proben während der Lagerungszeit bei 4C im Kühlschrank oder bei -2oC in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt wurden (vgl. HAASS & HENKE (31)).
Auf einen Aktivitätsverlust deuten abgeschwächte Zymogramme hin,wenn die Proben älter als vier Wochen sind.Manchmal konnte sogar das "Verschwinden" einzelner Banden beobachtet werden.

4. DISKUSSION

4.1 VORTEILE DER ANGEWANDTEN ELEKTROPHORESEMETHODE

Der Nachweis des Enzyms Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase in Erythrozyten ist ein von vielen Untersuchern erfolgreich durchgeführtes Verfahren.Zudem ist das Untersuchungsmaterial mit routinemäßigen Methoden zu gewinnen.

Die Anwendung der Elektrophorese zur Auftrennung von gt-Isoenzymen wird ebenfalls von diversen Autoren beschrieben.Jedoch sind die dargestellten Banden je nach benutzter Methode verschieden (siehe Tab.4). Dadurch ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt.Die Brauchbarkeit älterer Methoden kann überdies angezweifelt werden,da nicht gesichert ist,ob nach deren Einführung entdeckte Varianten mit ihnen überhaupt erkannt werden können.

Unbestritten dürfte gegenwärtig die Verwendung von Tris-Puffer-Systemen in Verbindung mit der Stärke- oder Agarosegelelektrophorese zur gt-Isoenzymdarstellung sein.

Das in dieser Untersuchung angewandte Stärkegelelektrophorese-Verfah en hat gegenüber anderen Methoden einige Vorteile:Es wird nur ein Puffersystem für Kammerfüllung und Gelherstellung benötigt.Die Verwendung von Tris-Puffer reduziert die Hintergrundfärbung (91),so daß sich die Banden vom Gel besser abheben.Für die Darstellung der Banden hat sich bei uns die Methode von BISSBORT (14) bewährt.

Der Zusatz von ß-Mercaptoäthanol und die Sichtbarmachung der Zymogramme mit Hilfe von ultravioiettem Licht entfällt,da keine fluorescierende Bandendarstellung erfolgt.

Die Banden bleiben bei kühler und dunkler Aufbewahrung mehrere Stunden ablesbar.Die fotografische Dokumentation ist einfach.Sonneneinstrahlung auf die angefärbte Geloberfläche ist unbedingt zu vermeiden,da sich sonst sofort eine starke Färbung der gesamten Oberfläche einstellt.Ein weiteres Ablesen ist dann unmöglich.

Bei mehrfacher Wiederholung der Elektrophorese mit den gleichen Blutproben ergab sich einwandfreie Reproduzierbarkeit der Bandenmuster.

4.2 EINFLUSS DER EINGEIMPFTEN HÄMOLYSATMENGE AUF DIE BANDENMUSTER

Die Menge des eingeimpften Hämolysats hat offensichtlich weitgehend

keinen Einfluß auf die Darstellung der Banden.Mit etwas verkleinerten Filterpapierplättchen (o.4 x o.5 mm) konnte ebenfalls die Darstellung der verschiedenen Phänotypen erreicht werden.Auch bei Einsetzen von zwei Filterpapierplättchen in das Gel ergaben sich keine Veränderungen (35).
Trotzdem scheint es ratsam,eine einheitliche Größe der Plättchen und stets die gleiche Anzahl zu benutzen,da das Verhalten von seltenen oder vielleicht noch unbekannten Varianten bis jetzt noch nicht getestet worden ist.

4.3 HALTBARKEIT DER GALAKTOSE-1-PHOSPHAT-URIDYLTRANSFERASE

Abweichende Angaben über die Haltbarkeit des Enzyms finden sich bei den einzelnen Untersuchern.So beobachtet DONELL (25) ein Nachlassen der Enzymaktivität bei tiefgefrorener Lagerung gewaschener Erythrozyten nach zwei Wochen.Blut,bei 4C in ACD-Lösung,Heparin oder EDTA über vier Wochen gelagert,behielt seine volle Enzymaktivität, berichtet BEUTLER (12).Sterile,heparinisierte Proben verloren über einen Zeitraum von 14 Tagen nicht signifikant an Aktivität.Es wird sogar von Gewebsproben aus Leber,Herz und Niere berichtet,die nach einjähriger Lagerung bei -2oC keinen nennenswerten Transferaseaktivitätsverlust aufwiesen (2o).
Die Indiana-Variante macht allerdings grundsätzlich eine Ausnahme. Bei 4C als Heparinblut aufbewahrt verschwindet die meßbare Enzymaktivität innerhalb von 36 Stunden.In einem isotonischen Phosphatpuffer hielt sich nachweisbare Aktivität nicht länger als 24 Std., während normale Proben über 72 Std. keine Aktivitätsminderung erlitten.
Zweifellos spielen nicht nur die Lagerung und Alterung,sondern auch das zum Nachweis des Enzyms benutzte Verfahren eine Rolle für die Dauer der Verwendbarkeit der Proben.Unter den in dieser Studie beschriebenen Bedingungen der Lagerung und Bearbeitung scheint es nicht empfehlenswert,Proben für die gt-Bestimmung zu verwenden,die länger als vier Wochen gelagert wurden.

4.4 ZUSAMMENHANG DES AUFTRETENS VON ENZYMVARIANTEN UND ERKRANKUNGEN

Auffällig ist,daß bei einigen Patienten mit Retikulozytose oder hypochromen Erythrozyten besonders hohe Enzymaktivitäten gemessen wurden. Bei Patienten mit Anämie fand BEUTLER (5) erniedrigte Werte.Heterozygote fanden sich häufiger als zu erwarten bei an Morbus Hodgkin Erkrankten (89).Wie es sich mit dem Einfluß solcher Erkrankungen auf die Zymogramme verhält,wurde bis heute noch nicht untersucht.
Ein direkter Zusammenhang von geistigen Entwicklungsstörungen und dem Vorhandensein des stummen Allels gt^G wurde zwar vermutet,aber nie bewiesen.So fand sich auch bei der Untersuchung von Geistesgestörten kein häufigeres Auftreten von gt^G (6,36).Es wurde erörtert, bei heterozygoten gt^G-Carriern eine in utero - Toxizität der Galaktose zur geistigen Retardierung führt (82).Bei der Überprüfung von Eltern galaktosämischer Kinder wurden nur normale IQ-Werte gefunden.
Sicher ist jedenfalls,daß bei Patienten mit DOWN-Syndrom die Enzymaktivitätswerte erhöht sind (63,65).Bei 28 Patienten ergab sich eine Transferase-Aktivität vom 2.7fachen des Normalwertes (69).Ein Patient mit Translokationsmongolismus wies die Erhöhung nicht auf.

4.5 DIE s-BANDE

Zusätzlich zu den üblichen Banden fiel beim Typ gt(N) als Besonderheit in einer Anzahl von Fällen das Auftreten der s-Bande auf.Es spricht nichts dafür,das hier ein anderer Typ als gt(N) vorliegt.Auch konnte eine Weitervererbung der s-Bande in den untersuchten Familien nicht beobachtet werden.
Wohl fand sich bei 22 bolivianischen Indianerblutproben die s-Bande durchweg bei allen Untersuchten.
Es kann daher nur empfohlen werden,die s-Bande bei deren Auftreten zu dokumentieren.

4.6 VERGLEICH DER POPULATIONSGENETISCHEN DATEN

Die erhobenen Daten der populationsgenetischen Untersuchung sind zum Vergleich mit den Angaben der Literatur in Tabelle 1o und 11 zusammengetragen.Der direkte Vergleich ist teilweise problematisch,da

von vielen Untersuchern nicht die Allele gt^D und gt^{LA} unterschieden werden.In Tabelle 11 sind deshalb,um einen Vergleich der Daten zu ermöglichen,gt(D) und gt(LA) zu Gt 2 und gt(N-D) und gt (N-LA) zu Gt 2-1 zusammengezogen.

Zu beachten ist auch,daß Genfrequenzen nicht ohne weiteres für ein anderes als das Erhebungsgebiet geltend angesehen werden können. Diese Daten sind nur im Bereich der untersuchten Population zutreffend.So bemerkt auch RITTER (73) : "Man muß mit der Existenz von mehr oder minder distinkten regionalen Genpools rechnen,die u.U. erheblich abweichen von dem deutschen Genpool,den wir unseren Statistiken zugrunde legen."

Unterschiede bestehen ganz offensichtlich,wie Tabelle 1o deutlich macht.Wohl muß man bezweifeln,ob die kleinen Stichprobenumfänge der Untersuchungen von NG (67) für einen Vergleich herangezogen werden können.Zudem fehlt für die untersuchten Kollektive eine klare Rassendefinition.Es ist lediglich von "American Negroes" und "Orientals" die Rede.Läßt man diese Daten nämlich einmal außer Acht,so schwanken beim Typ gt(N-D) die Angaben von 5.7-13.4 % in den Vereinigten Staaten. Die Zahlen für Deutschland liegen mit 6.3% im unteren Bereich der für die USA angegebenen Daten.

Beim Typ gt(N-LA) liegen die Zahlen beider US-Untersuchungen und dieser Studie sehr nahe beieinander.In der Praxis fast keine Unterschiede bestehen bei gt(D),gt(D-G) und gt(LA) (Tab. 1o).

Wesentlich mehr Vergleichsmaterial steht zur Verfügung,wenn man die Allele gt^D und gt^{LA} zu Gt^2 zusammenzieht (Tab.11).Alle in Tabelle 1 unter gt^N aufgeführten Allelbezeichnungen sind in Tabelle 11 als Gt 1 bezeichnet,alle unter gt^{LA} und gt^D genannten zu Gt 2.

Es fällt auf,daß die Daten,die in der Gelelektrophorese erhoben wurden,gut übereinstimmen.Die gefundenen Phänotypen Gt 1,die dem Typ gt(N) entsprechen,differieren in ihrer Häufigkeit von 8o.6-88.8 %, wenn man die sehr kleinen Stichprobenumfänge von NG (67) wieder außer Betracht läßt.

Der Typ Gt 2-1 findet sich in 1o.5-17.9 % der untersuchten Fälle. Der Typ Gt 2,unter dem die Daten von gt(D) und gt(LA) aus Tabelle 1o zusammengefaßt sind,wird zwischen o.18 und o.9 % angegeben.Von diesen

LAND	n	gt(N)	gt(N-D)	gt(D)	gt(N-LA)	gt(D-G)	gt(LA)	AUTOR UND JAHR DER UNTERSUCHUNG
USA	4oo		12.o%		4.o%			NG 1971
	418	8o.6%	13.4%	(o.2%)	4.5%	(o.2%)	(o.7%)	NG 1973
	1o7	89.7%	3.7%	(o.9%)	3.7%		(o.9%)	NG 1973 (NEGRIDE)
	1o5	98.o%	(2.o%)					NG 1973 (ORIENTALIDE)
	435	87.1%	5.7%	o.2%	6.2%			SPARKES 1977
GRIECHENLAND	157o	88.8%	1o.1%	o.3%				THOMAKOS 1977
DEUTSCHLAND	727	88.8%	6.3%	o.3%	4.3%	o.1%	o.4%	EIGENE UNTERSUCHUNG

TABELLE 1o : Phänotyphäufigkeiten im Drei-Allel-System.Alle Daten wurden mit der Stärkegelelektrophorese gewonnen.Zahlenangaben in Klammern wurden nicht angegeben,sondern aus dem Text berrechnet.

LAND	n	Gt 1	Gt 2-1	Gt 2	METHODE	AUTOR UND JAHR DER UNTERSUCHUNG
DEUTSCHLAND	595	(86.1%)	(13.4%)	(o.5%)	2	BISSBORT 1972 SÜDWESTDEUTSCHLAND
	863		12.4%		1	KALOUD 1972 FRANKEN
	545	(86.4%)	(13.o%)	(o.6%)	3	KÜHNL 1974 HESSEN
	558	87.8%	12.o%	o.2%	3	MARTIN 1975 BERLIN
	727	88.8%	1o.8%	o.7%	2	VORLIEGENDE UNTERSUCHUNG NORDRHEINWESTFALEN
GRIECHENLAND	157o	88.8%	(1o.5%)	o.3%	1,2	THOMAKOS 1977
ÖSTERREICH	931		11.1%		1	KALOUD 1972 STEIERMARK
SCHWEIZ	1o98	84.4%	15.1%	o.5%	3	PFLUGSHAUPT 1976
USA	638	(95.1%)	(3.4%)	(1.5%)*	1	BEUTLER 1965
	2172	(89.3%)	(1o.4%)	(o.3%)	1	BEUTLER 1966
	1oo	(93.o%)	(5.o%)	(1.o%)	1	MELLMAN 1968

TABELLE 11 TEIL 1

FORTSETZUNG SEITE 37

LAND	n	Gt 1	Gt 2-1	Gt 2	METHODE	AUTOR UND JAHR DER UNTERSUCHUNG
USA	400		(16.0%)		1,2	NG 1971
	418	(80.6%)	(17.9%)	(0.9%)	1,2	NG 1973
	107	(89.7%)	(7.4%)	(1.8%)	1,2	NG 1973 NEGRIDEN
	105	(98.0%)	(2.0%)		1,2	NG 1973 ORIENTALIDEN
	435	(87.1%)	(11.9%)	(0.2%)	2	SPARKES 1977
WESTUNGARN	3653		(1.8-6.4%)		1	SITZMANN 1978

TABELLE 11 TEIL 2 : Phänotyphäufigkeit im Zwei-Allel-System.Die Zahlenangaben in Klammern wurden von den betreffenden Autoren nicht direkt angegeben,sondern aus dem Text errechnet.

METHODE : 1 = Enzymaktivitätsmessung;2 = Stärkegelelektrophorese;3 = Agarosegelelektrophorese.

* = enthält evtl. Gt 0-1 (entspr. gt(N-G))

noch recht einheitlichen Werten weichen allgemein die Angaben,die aufgrund von Aktivitätsmessungen gemacht werden,ab,und das teilweise sogar in beträchtlichem Ausmaß.

Innerhalb des aus Deutschland vorliegenden Zahlenmaterials sind die Schwankungen viel geringer.Man darf annehmen,daß die Genfrequenzen in ganz Deutschland doch ziemlich einheitlich sind.Das schließt freilich nicht aus,daß es relativ abgeschlossene Populationen mit einem regionalen Genpool gibt,mit der Konsequenz völlig abweichender Frequenzen.

Die von den einzelnen Untersuchern berrechneten Genfrequenzen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

LAND	$Gt^1 = gt^N$	$Gt^2 = gt^D + gt^{LA}$	UNTERSUCHER/JAHR
DEUTSCHLAND	o.9277	o.o723 *	BISSBORT 1972
		o.o67	KALOUD 1972
	o.9294	o.o7o6	KÜHNL 1974
		o.o62	MARTIN 1975
	o.9388	o.o6o **	VORLIEGENDE STUDIE
GRIECHENLAND	o.942	o.o548	THOMAKOS 1977
ÖSTERREICH		o.o56	KALOUD 1972
SCHWEIZ	o.92o	o.o8o	PFLUGSHAUPT 1976
USA		o.o55	BEUTLER 1966
	o.955	o.o4	MELLMAN 1968

TABELLE 12 : Zusammenstellung der von verschiedenen Untersuchern berechneten Genfrequenzen.

* = angegebene Abweichung $\pm$ o.oo75

** = Setzt sich aus den Einzelfrequenzen von gt^D und gt^{LA} zusammen.(gt^D = o.o366; gt^{LA} = o.o234)

Das alleinige Vorliegen des Typs gt(N) fanden WEITKAMP & NEEL (97).Es wurde keine einzige Variante gefunden.

Sehr ähnliche Ergebnisse scheint die Untersuchung einer kleinen Stichprobe von 22 bolivianischen Indianern anzudeuten.Alle 22 im Verlaufe dieser Studie betrachteten Indianer-Blutproben zeigten den Typ gt(N).

4.7 VERERBUNGSMODUS DER ALLELE

Insgesamt 383 Mutter-Kind-Paare haben verschiedene Autoren untersucht und keine Widersprüche zum angenommenen Vererbungsmodell gefunden (15, 56,71).Diese Ergebnisse wurden von ihnen als Bekräftigung der These: Zwei Allele Gt^1 und Gt^2 an einem autosomalen Locus gewertet.
Bei den 81 in dieser Studie überprüften Mutter-Kind-Verbindungen ergab sich für die Allele gt^N,gt^D und gt^{LA} keine Konstellation,die nicht hätte auftreten dürfen,wenn gelten soll: Drei autosomale Allele gt^N, gt^D und gt^{LA} an einem Locus.
Als Vererbungsmodell wird ein autosomal kodominanter Mechanismus angenommen.

4.8 VORTEILE DES DREI-ALLELE-SYSTEMS IN DER ABSTAMMUNGSBEGUTACHTUNG

Für das serologische Abstammungsgutachten ist das gt-Isoenzymsystem eine interessante Bereicherung.Weniger innerhalb des routinemäßigen Bestimmungszyklus,als vielmehr in schwierigen Fällen als zusätzliche Hilfe vermag es wertvolle Hinweise zu geben oder einen Ausschluß anzuzeigen.
Im Zwei-Allele-System beträgt die Ausschlußwahrscheinlichkeit nach der Formel von STEINHAUS (4) berechnet 3.84 %.Nach KÜHNL (5o) bietet das gt-Isoenzymsystem eine etwas bessere allgemeine Vaterschaftsausschlußchance (Abk.: AVACH) als das ADA-System.Die AVACH wird heute mit 8 % angegeben,wobei die Aufsplittung des seltenen Allels Gt^2 in gt^D und gt^{LA} eine leichte Erhöhung der AVACH bewirkt.
Die Verwendung der Isoelektrischen Fokussierung verbessert die AVACH nicht (51),so daß sie unter diesem Gesichtspunkt keine Vorzüge gegenüber der Stärkegelelektrophorese der gt bietet.
Alle bislang in Deutschland durchgeführten Studien zur Verteilung des Polymorphismus der gt berücksichtigen nur zwei Allele,Gt^1 und Gt^2.In der vorliegenden Arbeit wird erstmals das System mit drei Allelen für eine Verteilungsuntersuchung herangezogen.
Bis 1973 hätte man noch davon ausgehen können,daß es sich lediglich um einen Unterschied in der Nomenklatur gehandelt hätte,wenn von Gt^2 und gt^D die Rede war.Seit Entdeckung des Allels gt^{LA} ergeben sich jedoch

erhebliche Unterschiede.Der Vergleich der Tabellen 3 und 13 zeigt dies: Die Phänotypen gt(N-LA) und gt(LA) kamen hinzu.Man könnte annehmen,daß diese bisher unter Gt 2-1 und Gt 2 verborgen waren.Jedenfalls wird die Annahme des Zwei-Allele-Systems der Existenz des gt^{LA}-Allels nicht gerecht.

PHÄNOTYPEN	GENOTYPEN
gt(N)	gt^N/gt^N, gt^N/gt^G
gt(N-D)	gt^N/gt^D
gt(D)	gt^D/gt^D
gt(N-LA)	gt^N/gt^{LA}
gt(LA)	gt^{LA}/gt^{LA}, gt^D/gt^{LA}, (gt^G/gt^{LA})
gt(D-G)	gt^D/gt^G

TABELLE 13 : Zuordnung möglicher,zugrundeliegender Genotypen zu den Phänotypen.

War früher bei der Enzymaktivitätsmessung gt^N/gt^G nicht von gt^D/gt^D auseinanderzutrennen (Tab.3),so hatte dieses Problem die Elektrophorese von MATHAI (57) schon gelöst.Doch kann mittels der Elektrophorese nicht zwischen gt^N/gt^G und gt^N/gt^N unterschieden werden (Tab.13).Der Genotyp gt^N/gt^G tritt allerdings bedingt durch die sehr geringe Frequenz von gt^G,die in der Literatur zwischen o.oo21 (95) und o.oo765 (7) angegeben wird,nur selten auf.

Bei Auftreten des Phänotyps gt(LA) können die Genotypen gt^{LA}/gt^{LA} oder oder gt^D/gt^{LA} lauten.Obwohl bisher noch nicht beschrieben muß doch angenommen werden,daß ebenso durch den heterozygoten Typ gt^G/gt^{LA} ein dem Phänotyp gt(LA) sehr ähnliches Muster beobachtet werden würde.Bei Vorliegen des Phänotyps gt(LA) muß zur sicheren Bestimmung des Genotyps deshalb eine Familienuntersuchung durchgeführt werden.

Der unter 3.4 beschriebene Fall 2 macht die Bedeutung dieser Tatsache deutlich. Das Kind kann nicht nur den Genotyp gt^D/gt^{LA} haben,der von der Genkonstellation der Vaterschaft des Beklagten nicht widersprechen würde.Es kann genauso der Genotyp gt^{LA}/gt^{LA} zugrunde liegen.Das würde -wie gesagt- einen Ausschluß des Mannes bedeuten.

Im Drei-Allele-System liegt diese Möglichkeit immer im Blickfeld.Dagegen besteht im Zwei-Allele-System diese Ausschlußkonstellation nicht.Die Konfiguration Kindesmutter und Präsumptivvater Gt 2-1 und Kind Gt 2 wäre wohl als Hinweis auf die Vaterschaft betrachtet worden.
Wie kritisch es wäre,das Zwei-Allele-System noch zu benutzen,läßt sich deutlicher nicht demonstrieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 727 Personen aus Nordrheinwestfalen mit der Stärkegelelektrophorese auf ihren Phänotyp im gt-Isoenzymsystem untersucht.Sechs Phänotypen konnten nachgewiesen werden.
Die Genfrequenzen errechneten sich zu: $f(gt^N) = o.9388$, $f(gt^D) = o.o366$, $f(gt^{LA}) = o.o234$.
Dem angenommenen Vererbungsmodell widersprach keines der 81 untersuchten Mutter-Kind-Paare.
Aus 48 Fällen strittiger Vaterschaft werden drei Fälle vorgestellt,an denen die Anwendung des gt-Isoenzymsystems bei der Abstammungsbegutachtung demonstriert wird.
Der Einfluß von Alterung und Lagerungsbedingungen auf die Verwendbarkeit der Blutproben wird erwähnt.
Es zeigt sich beim Vergleich der populationsgenetischen Daten eine weitgehende Übereinstimmung innerhalb des deutschen Zahlenmaterials.Im internationalen Vergleich fällt bei den in der Stärkegelelektrophorese erhobenen Daten eine geringere Schwankungsbreite als bei den mit anderen Methoden durchgeführten Bestimmungen auf.
Es handelt sich hier um die erste deutsche Untersuchung,die ein Drei-Allele-System benutzt.Dabei wird deutlich,daß das Drei-Allele-System eine zweckmäßige und differenzierte Beurteilungsgrundlage in der Hämogenetik darstellt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDERSON,E.P.;KALCKAR,H.M.;KURAHASHI,K.;ISSELBACHER,K.J.: A specific enzymatic assay for the diagnosis of congenital galactosemia, J.Lab. Clin.Med. 5o, 469 (1957)
2. APPLEGARTH,D.A.;DONELL,G.N.;MULLINGER,M.;NG,W.G.;LOWRY,R.B.: Study of a family with Los Angeles,Duarte,and classical galactosemia variants of galactose-1-phosphate uridyl transferase, Biochem.Med. 15, 2o6 (1976)
3. BELL,L.S.;BLAIR,W.C.;LINDSAY,S.;WATSON,S.J.: Galactose diabetes, J.Pediatr. 36, 427 (195o)
4. BERG,K.;SCHWARZFISCHER,F.;WISCHERATH,H.: Pathobiochemie der Galaktoseintoleranz und Verwendbarkeit des Enzyms Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Gt) in der Paternitätsbegutachtung, Med.Klin. 7o, 1881 (1975)
5. BEUTLER,E.;BALUDA,M.;DONELL,G.N.: A new method for the detection of galactosemia and its carrier state, J.Lab.Clin.Med. 64, 694 (1964)
6. BEUTLER,E.;DAY,R.;BALUDA,M.;POLK,K.: Screening for galactosemia among mentally retarded patients, J.Ment.Defic.Res. 9, 61 (1965)
7. BEUTLER,E.;BALUDA,M.;STURGEON,P.;DAY,R.: A new genetic abnormality resulting in galactose-1-phosphat uridyltransferase deficiency Lancet i, 353 (1965)
8. BEUTLER,E.;MATHAI,C.K.;BALUDA,M.C.: The Duarte variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase: Biochemical and electrophoretic studies, J.Lab.Clin.Med. 66, 853 (1965)
9. BEUTLER,E.;BALUDA,M.C.: A simple spot screening test for galactosemia, J.Lab.Clin.Med. 68, 137 (1966)
1o. BEUTLER,E.;BALUDA,M.C.;STURGEON,P.;DAY,R.W.: The genetics of galactose-1-phosphate uridyl transferase deficiency, J.Lab.Clin.Med. 68, 646 (1966)
11. BEUTLER,E.;BALUDA,M.C.: Biochemical properties of human red cell galactose-1-phosphate uridyl transferase from normal and mutant subjects, J.Lab.Clin.Med. 67, 947 (1966)
12. BEUTLER,E.;BALUDA,M.C.: Improved method for measuring galactose-1-phosphate uridyl transferase activity of erythrocytes, Clin.Chim. Acta 13, 369 (1966)

13. BISSBORT,S.;KÖMPF,J.: Population genetics of red cell galactose-1-phosphate-uridyl-transferase, Humangenetik 17, 79 (1972)
14. BISSBORT,S.;KÖMPF,J.: Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase: Elektrophoretische Darstellung, Z.Rechtsmed. 72, 119 (1973)
15. BISSBORT,S.;KÖMPF,J.: Zur formalen Genetik der Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase, Z.Rechtsmed. 72, 238 (1973)
16. BLAICH,R.: Analytische Elektrophoreseverfahren, 2.Aufl. Stuttgart, Georg Thieme Verlag (1978)
17. BRETTHAUER,R.K.;HANSEN,R.G.;DONELL,G.;BERGREN,W.R.: A procedure for detecting carriers of galactosemia, Proc.Nat.Acad.Sc. 45, 328 (1959)
18. BREWER,G.J.;TARLOV,A.R.: A clinical test for galactosemia, Am.J. Clin.Pathol. 39, 579 (1963)
19. CHACKO,C.M.;CHRISTIAN,J.C.;NADLER,H.L.: Unstable galactose-1-phosphate uridyl transferase: A new variant of galactosemia, J.Pediatr. 78, 454 (1971)
20. CONNELLAN,J.M.;BUCHANAN,V.: The presence of isozymes of hexose-1-phosphate uridyl-transferase from postmortem human liver,heart and kidney, Biochim.Biophys.Acta 364, 68 (1974)
21. DALE,G.L.;POPJAK,G.: Purification of normal and inactive galactosemic galaktose-1-phosphate uridyltransferase from human red cells, J.Biol. Chem. 251, 1057 (1976)
22. DE BRUYN,C.H.M.M.;RAYMAKERS,C.;WENSING,A.;OEI,T.L.;HÖSLI,P.: Enzymes of galactose metabolism in human hair roots, Br.J.Dermatol. 97, 487 (1977)
23. DE BRUYN,C.H.M.M.;RAYMAKERS,C.;WENSING,A.;OEI,T.L.: Galactose-1-phosphate uridyltransferase activities in erythrocytes from a patient with galactosemia: Discrepancy between two methods, Clin. Chim.Acta 78, 145 (1977)
24. DONELL,G.N.;BERGREN,W.R.;ROLDAN,M.: Genetic studies in galactosemia Pediatrics 24, 418 (1959)
25. DONELL,G.N.;BERGREN,W.R.;BRETTHAUER,R.K.;HANSEN,R.G.: The enzymatic expression of heterozygosity in families of children with galactosemia, Pediatrics 25, 572 (1960)
26. DONELL,G.N.;NG,W.G.;ALFI,O.S.;GREENE,A.E.;CORIELL,L.L.: Duarte variant-galactosemia heterozygote, Cytogenet.Cell Genet. 19, 53 (1977)

27. FENSOM,A.H.;BENSON,P.F.: Assay of galactose-1-phosphate uridyl transferase in cultured amniotic cells for prenatal diagnosis of galactosemia, Clin.Chim.Acta 62, 189 (1975)
28. GITZELMANN,R.;POLEY,J.R.;PRADER,A.: Partial galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency due to a variant enzyme, Helv.Paediatr. Acta 22, 252 (1967)
29. GÖPPERT,F.: Galktosurie nach Milchzuckergabe bei angeborenem, familiärem,chronischen Leberleiden, Berl.Klin.Wochenschr. 54, 473 (1917)
30. GRÜMER,H.D.: Stoffwechselbedingte Schwachsinnsformen und ihre Erkennung, Z.klin.Chem. 4, 123 (1966)
31. HAASS,E.;HENKE,J.: Untersuchung zur elektrophoretischen Stabilität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase nach Alterung unter verschiedenen Lagerungsbedingungen, 58.Jahrestagung d. Deutschen Gesellschaft f. Rechtsmedizin,Münster (1979)
32. HAMMERSEN,G.;LEVY,H.L.;FRIGOLETTO,F.;MANDELL,R.: Comparision of galactose-1-phosphate uridyl transferase in fetal and adult tissues, Clin.Chim.Acta 60, 281 (1975)
33. HAMMERSEN,G.;HOUGHTON,S.;LEVY,H.L.: Rennes-like variant of galactosemia: Clinical and biochemical studies, J.Pediatr. 87, 50 (1975)
34. HAMMERSEN,G.;MANDELL,R.;LEVY,H.L.: Galactose-1-phosphate uridyl transferase in fibroblasts: Isozymes in normal and variant states, Ann.Hum.Genet. 39, 147 (1975)
35. HAMMERSEN,G.;LEVY,H.L.: Starch gel electrophoresis for galactose-1-phosphate uridylyl-transferase applied to dried filter paper blood specimens, Clin.Chim.Acta 77, 295 (1977)
36. HANSEN,R.G.;BRETTHAUER,R.K.;MAYES,J.;NORDIN,J.H.: Estimatin of frequency of occurence of galactosemia in the population, Proc. Soc.Exper.Biol.Med. 115, 560 (1964)
37. HANSEN,R.G.: in:Galaktosemia, Hrsg.Hsia D.Y.Y.,Springfield (Ill.) Charles C.Thomas (1969)
38. HASCHEMIAN,G.;MENNE,F.: Beobachtung einer Familie mit Galaktosämie und Duarte-Variante, Humangenetik 15, 223 (1972)
39. HENKE,J.: Bemerkungen zur Stabilität einer Variante am 6PGD-Locus, Z.Rechtsmed. (1979) i.Dr.

40. HOLZEL,A.;KOMROVER,G.M.: A study of the genetics of galactosemia, Arch.Dis.Ch. 30, 155 (1955)

41. HSIA,D.Y.Y.: The laboratory detection of heterozygotes, Am.J.Hum. Genet. 9, 98 (1956)

42. HSIA,D.Y.Y.;Driscoll,S.G.: The heterozygous carrier in galactosemia, Nature 182, 1389 (1958)

43. HUNTER,R.L.;MARKERT,C.L.: Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels, Science 125, 1294 (1957)

44. ISSELBACHER,K.J.;ANDERSON,E.P.;KURAHASHI,K.;KALCKAR,H.M.: Congenital galactosemia,a single enzymatic block in galactose metabolism, Science 123, 635 (1956)

45. KALCKAR,H.M.;BRAGANCA,B.;MUNCH-PETERSEN,A.; Uridyl transferases and the formation of uridine diphosphogalactose, Nature 172, 1039 (1953)

46. KALCKAR,H.M.;ANDERSON,E.P.;ISSELBACHER,K.J.: Galactosemia,a congenital defect in a nucleotide transferase, Biochem.Biophys.Acta 20, 262 (1956)

47. KALCKAR,H.M.;ANDERSON,E.P.;ISSELBACHER,K.J.: Galactosemia,a congenital defect in a nucleotide transferase: A preliminary report, Proc.Nat.Acad.Sc. 42, 49 (1956)

48. KALOUD,H.;SITZMANN,F.C.: Genfrequenz der hereditären Galaktosämie unter Berücksichtigung der Duarte-Variante, Z.Kinderheilk. 113, 205 (1972)

49. KIRKMAN,H.N.;BYNUM,E.: Enzymic evidence of a galactosemic trait in parents of galactosemic children, Ann.Hum.Genet. 23, 117 (1959)

50. KÜHNL,P.;NOWICKI,L.;SPIELMANN,W.: Untersuchungen zum Polymorphismus der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase mittels Agarosegelelektrophorese, Humangenetik 24, 227 (1974)

51. KÜHNL,P.: Elektrofokussierung in der forensischen Serologie, Ärztl. Lab. 25, 39 (1979)

52. LELOIR,L.F.: The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivate, Arch.Biochem.Biophys. 33, 186 (1951)

53. LERMAN,S.I.: The lens in congenital galactosemia, Arch.Ophth. 88, 61 (1959)

54. LEVY,H.L.;SEPE,S.J.;WALTON,D.S.;SHIH,V.E.;HAMMERSEN,G.;HOUGHTON,S.; BEUTLER,E.: Galactose-1-phophate uridyl transferase deficiency due to Duarte/galactosemia combined variation: Clinical and biochemical studies, J.Pediatr. 92,39o (1978)

55. MARKUS,H.B.;WU,J.W.;BOCHES,F.S.;TEDESCO,T.A.;MELLMAN,W.J.;KALLEN,R.G.: Human erythrocyte galactose-1-phosphate uridyltransferase, J.Biol. Chem 252, 5363 (1977)

56. MARTIN,W.;KIENZLER,G.: Polymorphismus der menschlichen rythrozyten-Uridyltransferase.Untersuchung an einer Stichprobe aus der Berliner Bevölkerung, Blut 3o, 59 (1975)

57. MATHAI,C.K.;BEUTLER,E.: Electrophoretic variation of galactose-1-phosphate Uridyltransferase, Science 154, 1179 (1966)

58. MAXWELL,E.S.;KALCKAR,H.M.;BYNUM,E.: A specific enzymatic assay for the diagnosis of congenital galactosemia, J.Lab.Clin.Med. 5o, 478 (1957)

59. MELLMAN,W.J.;TEDESCO,T.A.: An improved assay of erythrocyte and leukocyte galactose-1-phosphate uridyl transferase: Stabilisation of the enzyme by a thiol protective reagent, J.Lab.Clin.Med. 66, 98o (1965)

6o. MELLMAN,W.J.;TEDESCO,T.A.;FEIGL,P.: Estimation of the gene frequency of the Duarte variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase, Ann.Hum.Genet. 32, 1 (1968)

61. MOHANDAS,T.;SPARKES,R.S.;SPARKES,M.C.;SHULKIN,J.D.: Assignment of the human gene for galactose-1-phosphate uridyltransferase to chromosome 9: Studies with Chinese hamster-human somatic cell hybrids, Proc.Natl.Acad.Sci. 74, 5628 (1977)

62. MONK,A.M.;HOLTON,J.B.: Galactose-1-phosphate uridyltransferase in cultured cells, Clin.Chim.Acta 73, 537 (1976)

63. NG,W.G.;BERGREN,W.R.;DONELL,G.N.: Galactose-1-phosphate uridyl-transferase assay by use of radioactive galactose-1-phosphate, Clin.Chim.Acta 1o, 337 (1964)

64. NG,W.G.;BERGREN,W.R.;DONELL,G.N.: An improved procedure for the assay of hemolysate galactose-1-phosphate uridyl transferase activity by the use of 14C-labeled galactose-1-phosphate, Clin.Chim.Acta 15, 489 (1967)

65. NG,W.G.;BERGREN,W.R.;FIELDS,M.;DONELL,G.N.: An improved electrophoretic procedure for galactose-1-phosphate uridyl transferase: Demonstration of multiple activity bands with the Duarte variant, Biochem.Biophys.Res.Commun. 37, 354 (2/1969)

66. NG,W.G.: Galactose metabolism of the red cell, Exp.Eye Res. 11, 4o2 (1971)

67. NG,W.G.;BERGREN,W.R.;DONELL,G.N.: A new variant of galactose-1-phosphate uridyltransferase in man: The Los Angeles variant, Ann.Hum. Genet. 37, 1 (1973)

68. NORDIN,J.H.;BRETTHAUER,R.K.;HANSEN,R.G.: Development and application of a simplified colorimetric method for detecting carriers of galactosemia, Clin.Chim.Acta 6,578 (1961)

69. NOTHJUNGE,J.;MOST,I.;HASS,I.;MENNE,F.: Bestimmung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase-Aktivität im Erythrocytenhämolysat von Patienten mit Down-Syndrom, Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 59 (1974)

7o. PESCE,M.A.;BOUDORIAN,S.H.;HARRIS,R.C.;NICHOLSON,J.F.: Enzymatic micromethod for measuring galactose-1-phosphate uridyltransferase activity in human erythrocytes, Clin.Chem. 23, 1711 (1977)

71. PFLUGSHAUPT,R.;SCHERZ,R.;BÜTLER,R.: Polymophism of human red cell adenosine deaminase,esterase D,glutamate pyruvate transaminase and galactose-1-phosphate-uridyltransferase in the Swiss population, Hum.Hered. 26, 161 (1976)

72. V.REUSS,A.: Zuckerausscheidung im Säuglingsalter, Wien.Med.Wochenschr. 58, 799 (19o8)

73. RITTER,H.: Serologische Statistik und erbbiologische Begutachtung, 7.Internat. Tagung d, Gesellschaft f. forensische Blutgruppenkunde, Hamburg (1977)

74. ROBINSON,A.: The assay of galactokinase and galactose-1-phosphate uridyl transferase activity in human erythrocytes, J.Exper.Med. 118, 359 (1963)

75. SACHS,L.: Angewandte Statistik,5.Aufl.,Berlin,Springer-Verlag (1978)

76. SCHAPIRA,F.;KAPLAN,J.C.: Electrophoretic abnormality of galactose-1-phosphate uridyl transferase in galactosemia, Biochem.Biophys. Res.Comm. 35, 451 (1969)

77. SCHAPIRA,F.;GREGORI,C.;POENARU,L.: Study of a family with both galactosemic and Duarte variants of galactose-1-phospho uridyl transferase, Biochem.Med. 11, 87 (1974)

78. SCHAPIRA,F.;GREGORI,C.;BANROQUES,J.: Microheterogeneity of human galactose-1-phosphate uridyl transferase.Isoelectrofocusing results, Biochem.Biophys.Res.Comm. 8o, 291 (1978)

79. SCHAPIRA,F.;GREGORI,C.;BOUE,J.;HENRION,R.;VIGNERON,C.;VIDAILHET,M.: Prenatal diagnosis of galactosemia, Biomedicine 29, 136 (1978)

8o. SCHERZ,R.;PFLUGSHAUPT,R.;BÜTLER,R.: A new genetic variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase, Hum.Genet. 35, 51 (1976)

81. SCHUTGENS,R.B.H.;BENTSSEN,W.J.M.;POOL,L.: An improved quantitative assay of galactose-1-phosphate uridyltransferase activity in erythrocytes based on the determination of glucose-1-phosphate generation, Clin.Chim.Acta 86, 3o1 (1978)

82. SCHWARZ,V.;WELLS,A.R.;HOLZEL,A.;KOMROVER,G.M.: A study of the genetics of galactosemia, Ann.Hum.Genet. 25, 179 (1961)

83. SEGAL,S.;BLAIR,A.;ROTH,H.: The metabolism of galactose by patients with congenital galactosemia, Am. J.Med. 38, 62 (1965)

84. SEGAL,S.: in: The metabolic basis of inherited disease,Hrsg.Stanbury, J.B.;Wyngaarden,J.B.;Frederickson,J.S.,New York,McGraw-Hill (1972)

85. SHIN-BÜHRING,Y.;OSANG,M.;ZIEGLER,R.;SCHAUB,J.: A method for galactose-1-phosphate uridyltransferase assay and the separation of its isozymes by DEAE-cellulose column chromatography, Clin.Chim. Acta 7o, 371 (1976)

86. SHIN-BUEHRING,Y.S.;BEIER,T.;TAN,A.;OSANG,M.;SCHAUB,J.: The activity of galactose-1-phosphate uridyltransferase and galactokinase in human fetal organs, Pediat.Res. 11, 1oo3 (1977)

87. SCHMIDT,E.;SCHMIDT,F.W.: Enzymologie in: Klinische Pathophysiologie, Hrsg. Siegenthaler,W.,3.Aufl.,Stuttgart,Georg Thieme Verlag (1976)

88. SITZMANN,F.C.;KALOUD,H.: Biokinetics of galactose in the homozygotes and heterozygotes of both forms of galactosemia, Clin.Chim.Acta 72, 343 (1976)

89. SITZMANN,F.C.;ISTVAN,L.;TEUBL,I.;KALOUD,H.;CHOLNOKY,P.: Frequenzanalysen für beide Arten der Galaktosämie in Westungarn, Wien.Klin. Wochenschr. 9o, 16 (1978)

9o. SMITHIES,O.: Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults, Biochem.J. 61, 629 (1955)

91. SPARKES,M.C.;CRIST,M.;SPARKES,R.S.: Improved technique for electrophoresis of human galactose-1-P uridyl transferase, Hum.Genet. 4o, 93 (1977)

92. SUN,N.C.;SUN,C.R.Y.;CHU,E.H.Y.: Regional chromosomal localisation of the human gene for galactose-1-phosphate uridyltransferase, Hum. Genet. 37, 279 (1977)

93. TEDESCO,T.A.: Human galactose 1-phosphate uridyltransferase,J.Biol. Chem. 247, 6631 (1972)

94. TEDESCO,T.A.;MELLMAN,W.J.: Galactosemia: Evidence for a structural gene mutation, Science 172, 727 (1971)

95. THOMAKOS,A.;BEUTLER,E.;STAMATOYANNOPOULOS,G.: Variants of galactose-1-pho phate uridyl transferase in the Greek populations, Hum.Genet. 36, 335 (1977)

96. WEINBERG,A.N.: Detection of congenital galactosemia and the carrier state using galactose C^{14} and blood cells, Metabolism 1o,728 (1961)

97. WEITKAMP,L.R.;NEEL,J.V.: The genetic structure of a tribal population the Yanomama Indians,Ann.Hum.Genet. 35, 433 (1972)

98. WIELAND,T.;PFLEIDERER,G.: Nachweis der Heterogenität von Milchsäure-dehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägergelelektrophorese, Biochem.Z. 329, 112 (1957)

99. WONG,L.J.;FREY,P.A.: Galactose 1-phosphate uridyltransferase,J. Biol.Chem. 249, 2322 (1974)

1oo. WONG,L.J.;SHEU,K.F.R.;LEE,S.L.;FREY,P.A.: Galactose-1-phosphate uridyltransferase: Isolation and properties of a uridylyl-enzyme intermediate, Biochemistry 16, 1o1o (1977)

LEBENSLAUF

1955	Als Sohn des Apothekers Everhard Haass und seiner Ehefrau Mathilde Haass,geb.Bongartz am 29.November in Straelen geboren
1962	Aufnahme in die Kath.Volksschule in Rheydt
1966	Eintritt in das Städt.Gymnasium Rheydt-Odenkirchen
1974	Abitur und Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
1976	Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf
1977	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf
198o	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf